



Universidade de Santiago de Compostela

Facultade de Bioloxía

Departamento de Bioloxía Celular e Ecoloxía

**“Caracterización de la variabilidad
intraespecífica en *Philasterides dicentrarchi*,
agente etiológico de la escuticolitosis del
rodaballo en cultivo”**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biología por:

Belén Budiño Rodríguez

Santiago de Compostela, Septiembre de 2011

Jesús Lamas Fernández, Profesor Titular del Area de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Ecología de la Universidad de Santiago de Compostela y **José Manuel Leiro Vidal**, Catedrático de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

Certifican:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "**Caracterización de la variabilidad intraespecífica en *Philasterides dicentrarchi*, agente etiológico de la escuticociliatosis del rodaballo en cultivo**" que, para optar al grado de Doctora en Biología, presenta **Doña Belén Budiño Rodríguez**, ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular y Ecología del CIBUS bajo nuestra dirección y que, considerándola concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, 28 de Septiembre de 2011

Fdo: Jesús Lamas Fernández

Fdo: José Manuel Leiro Vidal

Los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos de investigación:

Budiño B., Lamas J., Pata M.P., Arranz J.A., Sanmartín M.L., Leiro J. (2011). Intraspecific variability in several isolates of *Philasterides dicentrarchi* (syn. *Miamiensis avidus*), a scuticociliate parasite of farmed turbot. *Veterinary Parasitology*, **175**: 260-272.

Budiño B., Pata M.P., Leiro J., Lamas J. (2011). Differences in the in vitro susceptibility to resveratrol and other chemical compounds among several *Philasterides dicentrarchi* isolates from turbot. *Parasitology Research* (En prensa).

Budiño B., Lamas J., González A., Pata M.P., Devesa S., Arranz J.A., Leiro J. (2011). Coexistence of several *Philasterides dicentrarchi* strains on a turbot fish farm. *Aquaculture* (En prensa).

A mis padres y a mi hermana

A los que ya no están aquí

*Empty your mind. Be formless, shapeless. Like water.
You put water into a bottle and it becomes the bottle.
You put in a teapot, it becomes the teapot.
Water can flow, or it can crash.
Be water, my friend!*

Bruce Lee

... Y, al fin, el momento llegó: LA TESIS! Y llegó también el momento de los agradecimientos a toda la gente que, de una manera u otra, me ayudó a llegar hasta aquí.

A mis padres, por apoyarme siempre en mis decisiones y animarme a seguir, aunque hayan acabado aburridos de esta tesis, y por aguantarme y quererme a pesar de todos mis defectos. Sois unos padres geniales, y os admiro muchísimo a los dos, y espero ser capaz de devolveros algún día todo lo que hacéis por mi. A mi hermanita linda, que se enfadó porque no la nombré en los agradecimientos de la tesina, por ser la mejor hermana que alguien puede tener, y también porque sin ti andaría por la vida hecha una gualtrapas. A Diego, a quien considero parte de mi familia, por ser un *cuñao* tan guay. A mis abuelas, por ser como son y preocuparse tanto por mí, aunque no acaben de entender en qué etapa de mis estudios/etapa laboral estoy. Y al resto de mi familia, por ser como son e interesarse siempre por cómo me va.

A los jefes, Suso y Jose, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y haberme guiado todos estos años, y por su paciencia en todas esas veces que los puse “al borde del infarto”. A los dos, os agradezco sinceramente vuestra labor como tutores durante todos estos años (a Suso más, que me aguantó más años).

A Santiago Cabaleiro y la gente del Cluster de la Acuicultura de Galicia, por prestarnos sus instalaciones y por su colaboración en los ensayos de protección. A Sergio Devesa y Andrés (Happy Culti), por su colaboración en los muestreos.

A Charo, que me ayudó a arrancar en el departamento, y al resto del departamento de Biología Celular: a los “moldeados” y “celinandos”, por echar una mano siempre que lo necesité, y a los profesores por sus consejos y su interés. Y a Eva, el ángel apaciguador, por compartir conmigo su siempre valioso punto de vista ante todo.

A Jonal, mi “gurú moleculoso”, por toda la ayuda prestada, por sus valiosas opiniones, y por ser capaz de idear una forma de matarme con cualquier instrumento del laboratorio (qué cosas se agradecen, no?), y a Pedro, por todas esas conversaciones de intercambio de opiniones.

Agradecimientos

A Carla, con la que aprendí mano a mano a moverme por el laboratorio, por estar siempre dispuesta a echar una mano y por darme la solución a tantos problemas que, para mí, parecían no tenerla. Si no hubieras estado ahí, no habría sido tan divertido. Gracias por ser más que una compañera, por ser mi amiga. Te deseo toda la suerte del mundo donde sea que acabes.

Y a mis compañeritas del Lab2. A las carunchas: Raquel, con sus crisis y su veneno, que tiene un corazón que no le cabe en el pecho, y a Tania, el cuerpo del delito, por esa alegría que derrocha y contagia a los que la rodean... No se me ocurre cómo poner lo que quiero decir... os adoro a las dos!! A Manolo *Noia*, que llegó a convertirse en una “niña” más, por su ayuda (y paciencia) en los momentos de crisis. Y a la Moni que, aunque se fue, siempre seguirá siendo la *student*, única e inimitable. Y a las últimas incorporaciones al equipo de las “lamas”, Natalia y Berta, que tengáis suerte! Con todas vosotras compartí incontables momentos de cafés y copas, reuniones generales asesinatorias, conversaciones de apoyo, bailes, broncas, risas,... que no voy a olvidar nunca. Compañeritas, siempre os llevaré en mi *jort*.

A María, la abuela, mi “gurú estadística”, por su inestimable ayuda con los números (no sé qué habría hecho sin ti!) y sobre todo, por ser mi amiga y estar siempre dispuesta para unas cañas. A Lucía, por ser también una amiga tan es-tu-pen-da y por los ánimos y su ayuda final con la tesis (a pesar de haberse convertido en mi segunda “mami” e imponerme el toque de queda a las 12 de la noche mientras escribía); no cambies nunca, eres única!... A Alba, que siempre está ahí cuando hace falta, y a la alegría de la huerta, Carlota, que siempre consigue hacerme reír. A Salva, la tranquilidad personificada, por sus consejos y su amistad. Y en fin... a toda la gente de Santiago con la que compartí algún momento de esta etapa.

A Yáñez y Cayetano, que estuvieron a mi lado en mi aventura santiaguesa. A Fátima y Gabi, por todos esos findes en que me ayudaron (o obligaron) a desconectar de la tesis, y a los pitufos, que lo consiguieron siempre sin ningún esfuerzo. Y a mis actuales compañeros del Cluster, que me animaron en la recta final de la tesis.

Posiblemente me olvide de alguien, así que, en general: A todos... GRACIAS!!

Finalmente, quiero agradecer a las siguientes Instituciones su apoyo económico en la realización de esta Tesis Doctoral:

Ministerio de Ciencia e Innovación:

IMPROVEMENT OF AQUACULTURE PRODUCTION BY THE USE OF BIOTECHNOLOGICAL TOOLS. (MEJORA DE LA PRODUCCIÓN EN ACUICULTURA MEDIANTE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA)(AQUAGENOMICS). Ayudas de financiación estratégica de programas de actividad investigadora efectuadas por equipos de investigación de alto nivel, en el marco del Programa Consolider-Ingenio 2010. Convocatoria 2007. Referencia del Proyecto: INCITE07/PX1203039ES.

ESTUDIO DE LA INFLAMACIÓN EN RODABALLO INDUCIDA POR *Philasterides dicentrarchi*. ACTIVIDAD PARASITICIDA Y MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR VARIOS POLIFENOLES. Proyecto de Investigación del subprograma de Proyectos de Investigación fundamental no orientada del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica del Ministerio de Ciencia e Innovación. Referencia Proyecto: AGL2008-03866/ACU.

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA EN ESCUTICOCILIADOS DEL RODABALLO Y BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS PROTECTORES PARA SU DIAGNÓSTICO Y CONTROL. Programa Nacional de Proyectos de Investigación Fundamental. VI Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011. Código del Proyecto: AGL2010-21219/ACU.

ACTIVIDAD MODULADORA DEL RESVERATROL SOBRE LA INFLAMACION INDUCIDA POR ESCUTICOCILIADOS EN EL RODABALLO. Proyecto de Investigación del subprograma de Proyectos de Investigación fundamental no orientada, convocatoria 2011 del Plan Nacional I+D+i del Ministerio de Ciencia e Innovación. Referencia del Proyecto: AGL2011-29927-Co2-01.

Xunta de Galicia:

MEJORA DE UNA VACUNA FRENTE A *Philasterides dicentrarchi* PARA UN CONTROL EFICAZ DE LA ESCUTICOCILIATOSIS DEL RODABALLO EN CULTIVO. INCITE-Programas sectoriales de investigación aplicada. PEME+I+D e I+D Suma de la Xunta de Galicia. Código del Proyecto: o8MMA007237PR.

A: ancho corporal
ADN: ácido desoxirribonucleico
ANOVA: análisis de varianza de una vía
ARN: ácido ribonucleico
ARNr: ácido ribonucleico ribosómico
BSA: seroalbúmina bovina
Cc: cilio caudal
CDA: análisis canónico discriminante
Clustal W: programa de alineamiento múltiple progresivo de secuencias
Cox1: subunidad I de la citocromo oxidasa mitocondrial
Cp: citoprocto
CpG-ODNs: oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG
CVP: poro de la vacuola contráctil posterior
D.O.: densidad óptica
DAB: 3,3'-diaminobenzidina
dNTP: desoxinucleótidos trifosfato
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*
FBSi: suero fetal bovino inactivado por calor
GAM: modelo aditivo generalizado
IC50: concentración inhibitoria media (IC50)
Ig: inmunoglobulina
ITS: *internal transcribed sections*
kDa: kilodaltons
L: longitud corporal (L)
LBF: longitud del campo bucal
LD50: concentración de un químico que provoca el 50% de la mortalidad
LSUrRNA: subunidad grande del ARN ribosómico
Mac: macronúcleo
Md: meridiano director
Mic: micronúcleo
MLD: dosis letal mínima
NJ: método del vecino más próximo (*neighbour-joining*)
OPD: ortofenilendiamina
OPK1,2,3: policinéticas orales 1, 2 y 3
pb: pares de bases
PB: tampón fosfato
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PM1,2: partes 1 y 2 de la membrana paraoral
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ppm: partes por millón
PSA: solución penicilina/estreptomicina/anfotericina

PVDF: polifluoruro de vinilideno

RAPD: amplificación aleatoria de ADN polimórfico

RAS: sistema de recirculación para acuicultura

RESV: resveratrol

RFLP: polimorfismo en los tamaños de los fragmentos de restricción

ROS: especies reactivas de oxígeno

Sc: escutica

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato sódico

SSUrRNA o ARNr 18S: subunidad pequeña (18S) del ARN ribosómico

TBE: tampón Tris borato EDTA

TBS: tampón Tris salino

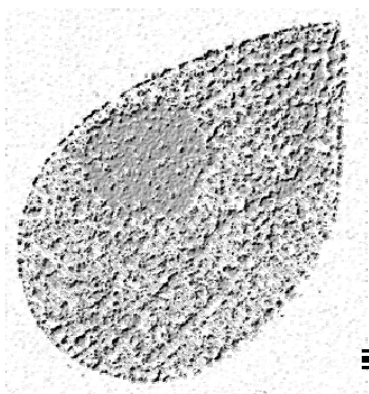
TBS-T: tampón TBS con 0,2% Tween 20

UR3: anticuerpo monoclonal de ratón anti-rodaballo

INTRODUCCIÓN	3
1. LA ACUICULTURA	3
2. EL RODABALLO	4
2.1. Características generales del rodaballo.....	4
2.2. Enfermedades que afectan al rodaballo en cultivo y su control	7
3. LOS CILIADOS	10
3.1. Morfología de los ciliados	10
3.1.1. Morfología general	10
3.1.2. Cambios morfológicos	13
3.2. Reproducción en ciliados	14
3.2.1. Tipos de reproducción en ciliados	15
3.2.2. Morfogénesis en ciliados	17
3.3. Sistemática de los ciliados	19
3.4. Los escuticociliados	21
4. EL PARASITISMO	22
4.1. Estrategias adoptadas por el parásito	22
4.2. Estrategias adoptadas por el hospedador	24
5. EL PARÁSITO HISTIÓFAGO <i>Philasterides dicentrarchi</i>	25
5.1. Morfología	25
5.2. Cultivo <i>in vitro</i>	28
5.3. Patología	28
5.3.1. Signos clínicos de la infección	28
5.3.2. Vías de entrada al hospedador	29
5.3.3. Estrategias exhibidas por los ciliados durante la infección	30
5.4. Técnicas de diagnóstico	31
5.5. Profilaxis y control	32
5.6. Filogenia	35
6. DETERMINACIÓN DE ESPECIES Y CEPAS EN CILIADOS	36
6.1. El concepto de “especie” en ciliados	36
6.2. Técnicas utilizadas en la determinación de especies	38
OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	49
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	49
2. OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS	49
3. CULTIVO DE LOS AISLADOS DE <i>Philasterides dicentrarchi</i>	49
3.1. Medios de cultivo	50
3.2. Mantenimiento de los parásitos en el laboratorio	51

4. PREPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS	51
4.1. Preparación de los extractos totales	51
4.2. Preparación de los antígenos de membrana	52
4.3. Determinación de la concentración de proteínas	53
5. OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS	53
5.1. Obtención de sueros de ratón	53
5.1.1. Obtención de sueros de ratón anti-aislado	53
5.1.2. Obtención de sueros de ratón anti-membrana	53
5.2. Obtención de sueros de rodaballo	54
5.2.1. Obtención de sueros de rodaballo anti-aislado	54
5.2.2. Obtención de sueros de rodaballo anti-membrana	54
5.3. Determinación de los niveles de anticuerpos en el suero	54
6. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS AISLADOS	55
6.1. Tinción carbonato de plata amoniacal modificada	56
6.2. Tinción Hemacolor	57
6.3. Fijación de los parásitos con formol tamponado	57
7. ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS AISLADOS	57
7.1. Extracción de ADN de los aislados del parásito	57
7.2. Amplificación por PCR, clonación y secuenciación del ADN	57
8. ANÁLISIS SEROLÓGICO DE LOS AISLADOS	60
8.1. SDS-PAGE	60
8.2. Transferencia y Western blot	60
8.3. ELISA	61
9. ANÁLISIS ECOFISIOLÓGICO DE LOS AISLADOS	62
9.1. Estudio del crecimiento <i>in vitro</i> de los aislados del parásito	62
9.2. Ensayos de susceptibilidad a quimioterápicos	63
9.3. Ensayos de competencia entre aislados	64
10. ENSAYOS DE PROTECCIÓN CRUZADA ENTRE AISLADOS.....	64
11. ANÁLISIS DE DATOS	65
11.1. Análisis de los resultados del análisis morfológico	65
11.2. Análisis de los resultados de los análisis genéticos	66
11.3. Análisis de los resultados de los análisis de protección cruzada	66
11.4. Análisis de los resultados de los análisis ecofisiológicos	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71

CAPÍTULO 1: Análisis morfológico de los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>	71
Antecedentes	71
Resultados	71
Discusión	83
CAPÍTULO 2: Análisis genético de los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>.....	91
Antecedentes	91
Resultados	92
Discusión	100
CAPÍTULO 3: Análisis serológico y de protección cruzada de los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>	107
Antecedentes	107
Resultados	108
Discusión	118
CAPÍTULO 4: Análisis ecofisiológico de los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>	125
Antecedentes	125
Resultados	127
Discusión	137
CAPÍTULO 5: Anormalidades morfológicas en aislados de <i>P. dicentrarchi</i>	145
Antecedentes	145
Resultados	146
Discusión	152
CAPÍTULO 6: Análisis de la variación intraespecífica en una piscifactoría.....	159
Antecedentes	159
Resultados	160
Discusión	177
DISCUSIÓN GENERAL	185
CONCLUSIONES	191
Anexo 1	195
BIBLIOGRAFÍA	203



INTRODUCCIÓN

1. LA ACUICULTURA

La Unión Europea define la Acuicultura como la *cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión. Los organismos acuáticos serán a lo largo de toda la fase de cría y hasta el momento de la recogida, propiedad de una persona física o jurídica.*

Debido a la dificultad de la pesca extractiva para cubrir la creciente demanda mundial de pescado, la acuicultura se perfila como la mejor alternativa, a lo que se suma su potencial para contribuir al crecimiento de las economías nacionales como actividad económica clave y por la obtención de divisas por la exportación.

La producción global de acuicultura ha crecido de manera espectacular desde menos de 0,6 millones de t en 1950 (y un valor de menos de 400.000 euros) a 68,4 millones de t en 2008 (con un valor global aproximado de 84.791 millones de euros) (APROMAR, 2010), lo que representa una tasa de crecimiento anual de casi el 7,0 %. Según la FAO (FAO, 2007), la acuicultura representa actualmente el 47 % del alimento acuático mundial, y está previsto que siga aumentando hasta alcanzar el 50 % en 2015.

El éxito de la acuicultura moderna se basa en el control sobre la reproducción de las especies, en el mejor conocimiento de su biología, en las innovaciones tecnológicas y en el desarrollo de alimentos específicos. Durante las tres últimas décadas la acuicultura se ha desarrollado, se ha diversificado y ha registrado importantes adelantos tecnológicos.

La Comisión Europea recogió, a finales del 2002, en el documento “*Estrategia para el desarrollo sostenible de la acuicultura europea*”, la necesidad de que la acuicultura garantice a los consumidores productos sanos, seguros y de buena calidad, manteniendo la competitividad, la productividad y la sostenibilidad del sector.

En el ranking mundial, España ocupa la posición 19ª con 249,1 miles de t., perdiendo un puesto respecto de 2007 (18ª) y dos respecto de 2006 (17ª). De entre los países de la Unión Europea, España es el país con una mayor producción en toneladas (APROMAR, 2010).

2. EL RODABALLO

2.1. Características generales del rodaballo

El rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758), es un pez teleósteo perteneciente al Orden Pleuronectiformes y a la familia Scophthalmidae. Se incluye dentro de la denominación común de peces planos debido a que su carácter bentónico les hace sufrir una metamorfosis peculiar durante las primeras fases pelágicas de su vida: la



Figura 1. Rodaballo mimetizándose con el fondo arenoso.

migración del ojo derecho al otro lado del cuerpo y el aplanamiento del lado del cuerpo que está en contacto con el fondo.

La distribución geográfica de rodaballo se extiende desde el Mar Negro, a través del Mediterráneo, a lo largo de la costa oeste de Europa, a las Islas Británicas y las Islas Feroe y además al mar Báltico y a lo largo de la costa noruega (Muus *et al.*, 1998).

El rodaballo se caracteriza por tener el cuerpo redondeado y la piel sin escamas, aunque con tubérculos óseos distribuidos por la parte del cuerpo pigmentada. La cara que posee los ojos está pigmentada con color variable, grisáceo o marrón, debido a su mimetismo para adaptarse al fondo en donde vive, mientras que la cara oculta es blanca. Los ojos están situados en el lado izquierdo de la cabeza y la boca es grande y oblicua, adelantándose la parte anterior de la mandíbula inferior a la mandíbula superior. Los radios de la aleta dorsal están poco ramificados, y se unen por la membrana, comenzando por encima del ojo superior y aumentan gradualmente hasta la parte media del

cuerpo, y después disminuyen también gradualmente hasta los extremos. Las aletas caudal y anal terminan en la base del pedúnculo caudal. La aleta caudal es redondeada, y la anal es semejante a la dorsal. La aleta pectoral de la cara superior es más grande que la de la cara inferior.

En el medio natural, el ciclo vital del rodaballo se puede dividir en tres etapas ontogénicas caracterizadas por un cambio en la distribución y asociación de hábitat. En una primera etapa planctónica, los huevos y larvas neustónicos son transportadas desde los lugares de desove en alta mar hasta las zonas costeras en donde se asienta el rodaballo (Riley *et al.*, 1981). Tras establecerse, los juveniles se mantienen en zonas costeras poco profundas, aumentando gradualmente su profundidad a medida que aumentan de tamaño. Y finalmente, alrededor de los 3-4 años, dependiendo del sexo, el rodaballo alcanza la maduración sexual y migra lejos de la costa para el desove. La alimentación consiste principalmente en otros peces tales como sardina, anchoa y gádidos comunes.

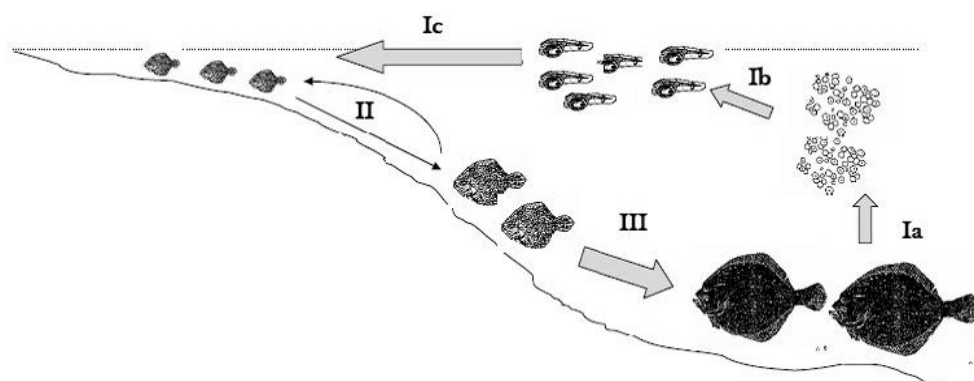


Figura 2. Esquema del ciclo biológico del rodaballo en el medio natural.

Las investigaciones realizadas durante los 20 últimos años han repercutido en la aplicación industrial del cultivo de rodaballo, cuya producción industrial está ya totalmente desarrollada. Actualmente, las plantas de cultivo de rodaballo, a las que inicialmente se transfirieron los conocimientos científicos obtenidos a escala experimental, desarrollan su propia tecnología sobre su cultivo y la mayor parte de ellas, que inicialmente engordaban alevines procedentes de criaderos europeos, disponen ya de su propia tecnología para autoabastecerse de alevines.

En Galicia, el cultivo de rodaballo se inició a finales de los años 70, con las primeras experiencias de cría larvaria. En los años 80 comenzaron las experiencias de engorde hasta el tamaño comercial, y su rápido crecimiento en cautividad y su resistencia a enfermedades hicieron de este cultivo una promesa a finales de los 80.

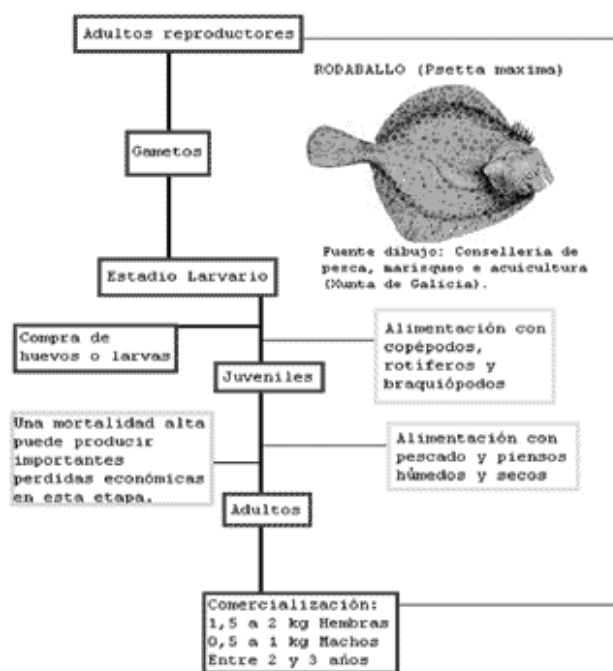


Figura 3. Esquema del ciclo productivo del rodaballo en acuicultura.

El cultivo intensivo del rodaballo se realiza en tanques relativamente pequeños con altas densidades tanto de larvas como de presas, lo que exige un mayor control del medio. El rodaballo es una especie con una elevada tasa de crecimiento que se incrementa con la temperatura (Brown *et al.*, 1984; Martínez-Tapia & Fernández-Pato, 1991a; Imsland *et al.* 1997), una baja mortalidad, un fácil manejo y permite altas

densidades de cultivo (Sánchez *et al.*, 1990; Fernández-Pato *et al.*, 1990; Martínez-Tapia & Fernández-Pato, 1991b).

El ciclo gonadal de esta especie está relacionado con el fotoperiodo al que se encuentra expuesto, lo que permite la inducción de la puesta todo el año. Tras la obtención de gametos, se continúa con la fecundación, que tras 6 u 8 días dará lugar a las larvas. La alimentación de las larvas se realiza con zooplancton producido en la propia planta, inicialmente a base de rotíferos y posteriormente a base de artemia. La metamorfosis se inicia a partir del día 15 y no finaliza por completo hasta transcurridos entre 45 y 60 días, y durante este periodo de crecimiento se realiza el cambio de alimentación vivo a alimento inerte (piensos). Este cambio se conoce como "destete" y sucede entre los 30 y 40 días (20 mm de longitud y un peso de 0,5-1 gramos), cuando está finalizando la

metamorfosis, siendo un momento crítico en el que se pueden producir grandes mortalidades a consecuencia de los cambios en la alimentación, aunque en la actualidad, con el uso de dietas adecuadas se suelen conseguir supervivencias superiores al 95%. A partir de aquí, comienza la etapa más sencilla y con mayor supervivencia dentro del cultivo de rodaballo (Jones 1970, 1972), en la que los juveniles continuarán su desarrollo alimentándose a base de piensos hasta alcanzar el tamaño comercial.. El rodaballo presenta un dimorfismo sexual en el crecimiento y en la maduración, siendo el crecimiento mayor en las hembras a partir de los 8 meses de vida.

La producción acuícola total de rodaballo en Europa en el 2009 ha sido de 9.246 t, un -2,7% de la cifra de 2008, siendo España el principal país productor con diferencia (83,3%), mientras que existen producciones sustancialmente menores en Portugal (5,8%) y Francia (5,7%) (JACUMAR, 2009). Producciones incipientes se dan en los Países Bajos, Reino Unido, Islandia y Dinamarca. Galicia es, con diferencia, la principal Comunidad Autónoma productora de rodaballo en España (97%) y en ella se producen, además, casi todos los alevines de esta especie (99,7%) (JACUMAR, 2009).

2.2. Enfermedades que afectan al rodaballo en cultivo y su control

En los últimos años, diferentes organismos públicos y privados han puesto especial interés en las patologías que afectan al rodaballo de granja. Las enfermedades pueden ser de origen bacteriano, fúngico, vírico o parasitario. Por ello, se debe poner especial cuidado en la calidad del agua utilizada, así como evitar en lo posible la entrada de parásitos y realizar las pertinentes vacunaciones y suministro de antibióticos. Los patógenos que afectan actualmente al rodaballo cultivado se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1):

	Patógeno	Referencia
VIRUS	Nodavirus	Johansen et al., 2004
	Virus de la septicemia hemorrágica (VSH)	Nishizawa et al., 2006
	Megalocitivirus	Oh et al., 2006
	Rhabdovirus	Zhang et al., 2007
BACTERIAS	<i>Listonella anguillarum</i>	Toranzo et al., 1987
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Nougayrede et al., 1990
	<i>Edwardsiella tarda</i>	Padrós et al., 2006 Castro et al., 2006
	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Piñeiro-Vidal et al., 2007
	<i>Streptococcus parauberis</i>	Romalde et al., 1999
	<i>Vibrio pelagius</i>	Villamil et al., 2003
	<i>Vibrio damsela</i>	Fouz et al., 1992
	<i>Vibrio splendidus</i>	Angulo et al., 1994
	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	López-Romalde et al., 2003
	<i>Mycobacterium marinum</i>	dos Santos et al., 2002
AMEBAS	<i>Neoparamoeba</i> sp.	Fiala y Dyková, 2003
	<i>Platyamoeba</i> sp.	Leiro et al., 1998
	<i>Paramoeba</i> sp.	Dyková et al., 1998
MICROSPORIDIOS	<i>Tetramicra brevifilum</i>	Figueras et al., 1992
MIXOSPORIDIOS	<i>Enteromyxum scophthalmi</i>	Palenzuela et al., 2002
APICOMPLEJOS	<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Álvarez-Pellitero et al., 2004a
	<i>Haemogregarina</i> sp.	Kirmse, 1978
CILIADOS	<i>Philasterides dicentrarchi</i>	Iglesias et al., 2001 Sterud et al., 2000 Ramos et al., 2007
	<i>Trichodina</i> spp.	Devesa, 1996
	<i>Costia</i> spp.	Novoa et al., 1992
CESTODOS	<i>Bothriocephalus scorpii</i>	Sanmartín et al., 1989

Tabla 1. Principales patógenos que afectan al rodaballo cultivado.

El control de las patologías del rodaballo se realiza mediante tres vías, principalmente:

a) **ANTIBIÓTICOS:** Estos compuestos se utilizan para controlar la mayoría de las infecciones bacterianas. Sin embargo, la acuicultura se enfrenta a serios problemas debidos a sus efectos adversos, como por ejemplo la acumulación en los tejidos con el consiguiente riesgo de presencia de residuos en los productos de la acuicultura, nocivos para los consumidores humanos intolerantes a los antibióticos (FAO, 2002), la aparición de bacterias resistentes (Aoki, 1992; Defoirdt *et al.*, 2007), la destrucción de la flora microbiana ambiental (Yousefian y Amiri, 2009; Stickney, 1997) y, en el caso de algunos antibióticos, el riesgo de supresión de la inmunidad natural del pez, incrementando el riesgo de infección por patógenos no bacterianos como virus, hongos o parásitos (Rijkers *et al.*, 1980; Siwicki *et al.*, 1989; Tafalla *et al.*, 1999, Lunden *et al.*, 1999, 2002). El número de antibióticos aprobados para su uso en acuicultura es bastante limitado.

b) **VACUNACIÓN:** El principal objetivo de la vacunación es la inducción de una protección específica a largo plazo frente a una determinada enfermedad. Es un método de prevención muy efectivo, pero su utilización se encuentra restringida a unas pocas enfermedades en las que se ha logrado aislar el agente etiológico. Las vacunas comerciales disponibles actualmente son vacunas bacterianas, existiendo sólo unas pocas vacunas virales y ninguna vacuna frente a parásitos (Sommerset *et al.*, 2005).

c) **INMUNOESTIMULANTES:** Una alternativa cada vez más en auge es el uso de sustancias inmunoestimulantes o inmunomoduladoras, que aumentan la resistencia a las enfermedades infecciosas mediante el aumento de los mecanismos de defensa no específicos, siendo bien conocido que los peces dependen más de estos mecanismos que los mamíferos (Anderson, 1992). Entre las sustancias que probaron ser efectivas como inmunoestimulantes en peces se incluyen agentes químicos, componentes bacterianos, polisacáridos, minerales, extractos de animales o plantas, factores nutricionales y citoquinas (Raa, 1996; Sakai, 1999; Sealey y Gatlin, 2001; Dalmo y Bogwald, 2008; Ganguly *et al.*, 2010).

3. LOS CILIADOS

Los ciliados son un grupo de organismos pertenecientes al suprareino Eukaryota, al superfilo Alveolata y al filo Ciliophora. Se estima que emergieron como grupo evolutivo hace más de 10^9 años, separándose de la línea eucariota que dio lugar a las plantas y animales antes de que aparecieran los hongos (Fleury *et al.*, 1992; Kumazaki *et al.*, 1983; Prescott, 1994), y evolucionando en un rico surtido de subgrupos que contienen varios miles de especies. Los protozoos representan uno de los grupos de organismos menos estudiados y esto se debe, particularmente en ciliados, a las dificultades metodológicas impuestas por su capacidad de formar quistes por largos períodos de tiempo (hasta 10 años) (Finlay *et al.*, 1996), por la presencia de especies hermanas que dificultan su cuantificación e identificación (Clarholm, 2005) y por el hecho de que algunas especies no son cultivables bajo condiciones de laboratorio.

Los miembros del filo Ciliophora están unidos por varias sinapomorfías, que incluyen el dimorfismo nuclear, la presencia de cilios locomotores organizados en cinetias a lo largo de la superficie corporal, cinetosomas (=cuerpos basales) y la red asociada de fibras del citoesqueleto que anclan los cilios, estructuras orales ciliadas que se replican durante la división celular por un proceso conocido como estomatogénesis, y sexualidad mediante recombinación nuclear (Curry y Butler, 1982). Estos atributos han sido utilizados para apoyar la idea de que los ciliados constituyen un grupo monofilético de protistas (Corliss, 1979; Fauré-Fremiet, 1950; Lynn y Small, 2002; Small y Lynn, 1985).

3.1. Morfología de los ciliados

3.1.1. Morfología general

La corteza es una porción especializada de la célula de organización compleja, encargada de mantener la forma de los individuos. Tiene un grosor total que varía de uno a varios micrómetros y comprende básicamente la película y la infraciliatura.

A la **película** pertenecen la membrana celular (plasmalema) y, en algunos casos, un perilema adicional (Modeo *et al.*, 2003; Song, 2005). Esta película queda delimitada por un sistema de membranas que comprende la membrana plasmática, una membrana alveolar externa y una membrana alveolar interna (Chapman y Kern, 1983; Fyda *et al.*, 2006). Próximas a los cilios se encuentran unas invaginaciones dispuestas regularmente denominadas sacos parasomales, que representan lugares de actividad endocítica (Allen *et al.*, 1992; Elde *et al.*, 2005). La película incluye una capa proteínica llamada epiplasma debajo de las vacuolas alveolares, y franjas longitudinales de microtúbulos citoesqueléticos que corren paralelos al epiplasma (microtúbulos supra y subepiplásmicos) (Paulin, 1996). Ambos componentes tienen posiblemente una función de estabilización, y juegan además un papel en la morfogénesis de la corteza (Adoutte y Fleury, 1996).

La ciliatura somática está compuesta por unidades ciliares discretas llamadas cinétidas, que poseen uno (monocinétidas), dos (dicinétidas) o varios (policinétidas) cinetosomas (Lynn y Small, 2002; Small y Lynn, 1985; Small, 1967). Los cinetosomas pueden poseer cilios o no. Las cinétidas pueden presentarse componentes individuales, dobles o múltiples, de ahí las monocinétidas y las dicinétidas somáticas, y las policinétidas orales.

Los cinetosomas están conectados a otros mediante cinturones microtubulares basales, microtúbulos postciliares y fibrillas cinetodesmales, lo que permite una exacta orientación longitudinal de los cinetosomas y de los cilios cuando éstos están presentes, y estas hileras longitudinales en las que se disponen los cilios se denominan cinetias (Paulin, 1996). Los diferentes patrones creados por las cinetias se utilizan como caracteres taxonómicos para la identificación y clasificación. Asociadas a los cinetosomas hay tres estructuras fibrilares: dos raíces microtubulares, los microtúbulos postciliares y transversales, y una raíz fibrosa, la fibra cinetodesmal. Estas raíces, que se denominan colectivamente infraciliatura, anclan el cilio y proporcionan soporte adicional a la superficie celular.

Los cilios pueden agruparse en dos categorías estructurales. Los cilios asociados con el citostoma y alrededor del área de alimentación forman la ciliatura oral, mientras que los cilios de la superficie corporal en general forman la ciliatura somática. Las estructuras orales de los ciliados son diversas y van acompañadas de especializaciones variadas en elementos basados en microtúbulos del citostoma (Corliss, 1974, 1979; Lynn y Small, 2002; Small y Lynn, 1985). Entre estas especializaciones destacan los cirros, que sirven para la locomoción, y las membranelas, que sirven para el arremolinamiento de las partículas de alimento (Banchetti y Erra, 2003; Wilks y Sleight, 2004).

La corteza contiene otros orgánulos, principalmente extrusomas y fibrillas contráctiles (mionemas), pero también mitocondrias, cisternas del retículo endoplasmático y diversos tipos de vesículas (Kurz y Tiedtke, 1993; Maloney *et al.*, 2005; Fyda *et al.*, 2006; Vd'ačný, 2007).

En casi todos los ciliados, la alimentación se limita a un área especializada oral que contiene el citostoma o "boca celular". En el citostoma se forman vacuolas fagocíticas, que luego se distribuyen a través del citoplasma donde se produce la digestión. Existen además diferentes complejos estructurales para eventos exocíticos que implican la fusión de las membranas vacuolares con el plasmalema: un citoprocto o citopigio para la expulsión de los residuos degradados de comida, y uno o más poros para la eliminación de los contenidos fluidos de las vacuolas contráctiles (Grim, 2006; Long *et al.*, 2007). Los ciliados almacenan los hidratos de carbono en forma de glucógeno.



Figura 4. Esquema que muestra los componentes generales de un ciliado tipo

3.1.2. Cambios morfológicos

Muchos ciliados pueden cambiar su estructura en respuesta a señales externas y/o internas. Cuando estos cambios están acompañados por una reabsorción y/o una construcción de partes nuevas de los organismos o de nuevos orgánulos, el proceso se denomina generalmente morfogénesis. Los ciliados pueden sufrir cambios morfológicos cíclicos o facultativos.

Cambios morfológicos cíclicos

Algunos ciliados adquieren diversas formas corporales según la fase de su ciclo vital en la que se encuentren. Cada fase se define normalmente con términos específicos (trofonte, tomonte, tomito, teronte): el trofonte reside y se alimenta en el epitelio de la piel y las branquias del hospedador donde crece aunque no se reproduce. Cuando deja de alimentarse da lugar al tomonte, que abandona el hospedador y forma un quiste reproductivo donde se producen repetidas divisiones, originando los tomites, que maduran antes de su salida del quiste, dando lugar a las formas infectivas (terontes) que nadan en busca de otro hospedador, empezando de nuevo el ciclo (Dickerson, 2006). Un ejemplo de estos cambios cíclicos lo tenemos en el ciliado parásito *Ichthyophthirius multifiliis*, que infecta varias especies de peces de agua dulce (Aguilar *et al.*, 2005, Aguilar, 2006; Jørgensen y Buchmann, 2007; González *et al.*, 2007a, b).

Cambios morfológicos facultativos

Estas variaciones morfológicas pueden ser causadas principalmente por factores externos (por ejemplo, salinidad, temperatura, pH del medio, suministro de alimento, defensa frente a predadores, exposición a contaminantes,...) e incluyen la formación de quistes, la adopción de diferentes morfologías (polimorfismo), etc.

Los quistes normalmente son estadios inactivos que presentan paredes gruesas y altamente resistentes constituidas por varias capas (Gutiérrez *et al.*, 2003; Foissner *et al.*, 2005; Foissner *et al.*, 2007). El enquistamiento implica cambios morfológicos y fisiológicos drásticos como, por ejemplo, una deshidratación citosólica, una disminución del volumen celular, una alta

actividad autofágica y cambios macronucleares (Gutiérrez *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2003; Martín-González *et al.*, 2005).

Los ciliados polimórficos son capaces de adoptar diferentes morfologías. Un caso de polimorfismo lo representa *Tetrahymena vorax*, que cambia de la forma microstoma a la forma macrostoma en presencia de *Tetrahymena thermophila* (Grønlien *et al.*, 2002). En *Tetrahymena pyriformis*, por ejemplo, se produce la disminución del tamaño celular, la reducción de su volumen interno y la variación de la forma celular en presencia de contaminantes metálicos (Mountassif *et al.*, 2007). Una vez que las condiciones vuelven a ser las habituales (alimento, ambiente, etc.), la célula revierte a su tamaño normal.

Varias especies de ciliados sufren cambios morfológicos como mecanismo de defensa ante ciertos predadores, y se cree que la modificación del citoesqueleto que induce estos cambios está inducida por sustancias secretadas por los predadores (Jerka-Dziadosz *et al.*, 1987; Wicklow, 1997). Estos cambios pueden consistir en aumento de tamaño y formación de unas extensiones laterales con forma de alas y salientes dorsales para evitar la ingestión por parte de los depredadores, como es el caso del ciliado *Euplotes octocarinatus* (Kuhlmann y Heckmann, 1985), o acortamientos y engrosamientos que dificultan su ingesta, como en el ciliado *Colpidium kleini* (Fyda *et al.*, 2006).

3.2. Reproducción en ciliados

El ADN de los ciliados está almacenado en dos tipos de núcleos: un núcleo germinal transcripcionalmente silencioso llamado micronúcleo, el cual se utiliza durante el emparejamiento para el intercambio sexual de ADN, y un núcleo somático llamado macronúcleo, que es transcripcionalmente activo y soporta el crecimiento vegetativo celular y la proliferación celular (Prescott, 1994).

Los micronúcleos son relativamente pequeños mientras que los macronúcleos, hiperploides, son mucho más grandes y polimórficos (Raikov y Kovaleva, 1990; Katz, 2001; Vd'ačný, 2007). Los micronúcleos, generalmente diploides, son los lugares de almacenamiento y recombinación del material genético, aunque no están envueltos en el mantenimiento y la regulación de las funciones celulares. Durante la fase de reproducción sexual, los macronúcleos normalmente sufren una degeneración y posteriormente son restablecidos a partir de los micronúcleos modificados (Katz, 2001).

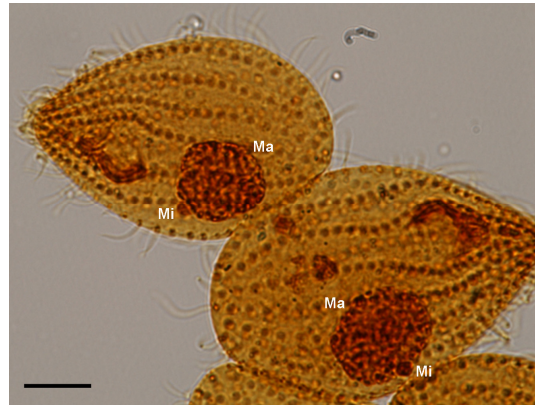


Figura 5. Imagen de ciliados de la especie *P. dicentrarchi* impregnados con carbonato de plata, en la que se pueden observar los macronúcleos (Ma) y micronúcleos (Mi). Barra=10 μ m.

3.2.1. Tipos de reproducción en ciliados

La reproducción asexual es el medio más común de replicación de los protozoos. Los protozoos de vida libre normalmente sólo recurren a la reproducción sexual cuando las condiciones ambientales se vuelven adversas, ya que este modo de reproducción aumenta la “fitness” de la población. Cuando el alimento y otras condiciones son favorables, se lleva a cabo la reproducción asexual.

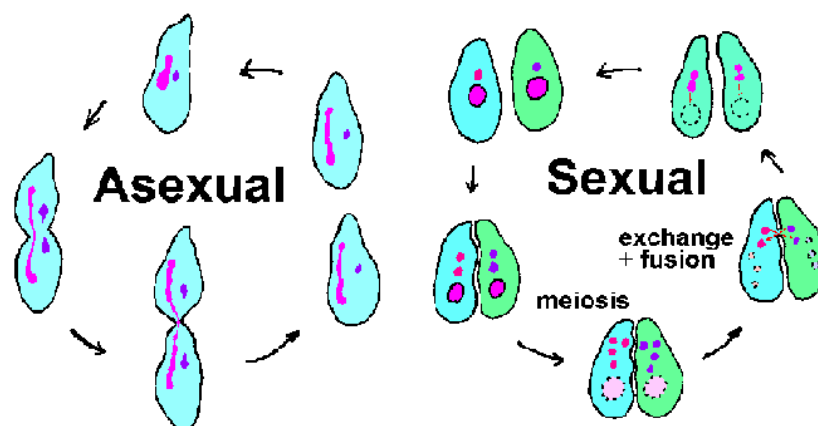


Figura 6. Esquema de los tipos de reproducción en ciliados

Reproducción asexual

La reproducción asexual de las especies de vida libre por lo general implica la división nuclear y la división mediante fisión binaria de la célula en dos células hijas idénticas del mismo tamaño. La división celular puede ser de dos tipos: monotómica o politómica. El tipo monotómico es el más frecuente entre la mayoría de los ciliados dando como resultado dos células hijas: el proter (célula hija anterior) y el opiste (célula hija posterior).

El plano de división celular varía entre los diferentes grupos y tiene importancia taxonómica. La mayoría de los ciliados se divide homotetogénicamente, es decir, el eje de división del proter y el opiste tiene la misma orientación. Los ciliados normalmente se dividen en un plano ecuatorial, o transversal, gracias a lo cual se mantiene el número correcto de cinetias. El aparato bucal y los cilios especializados alrededor de él se replican de manera diferente entre los distintos grupos de ciliados, dependiendo de la complejidad del citostoma. La replicación del citostoma precede a la división del citoplasma.

Reproducción sexual

La reproducción sexual en los protozoos ciliados toma la forma de conjugación. Este proceso no se traduce en un aumento en el número de individuos, sino que es un simple intercambio de material genético entre individuos de la misma especie.

Otro aspecto de la conjugación que merece mención son los tipos conjugantes. Los individuos de un mismo tipo conjugante genético (por ejemplo, miembros de un clon producido por fisión binaria) no pueden conjugarse con éxito con los demás. En otras palabras, la conjugación no es un evento al azar sino que sólo puede ocurrir entre miembros de diferentes tipos de apareamiento, o clones. Se supone que esta restricción garantiza una buena mezcla genética entre los individuos. La conjugación sólo se produce entre tipos conjugantes compatibles dentro de una especie, y cada especie puede contener muchos tipos conjugantes. Antes de que se produzca la conjugación, algunos ciliados liberan unas señales químicas especiales, llamadas gamonas, que

provocan que los conjugantes compatibles lleven a cabo los procesos que facilitan la conjugación. En otros ciliados, como *Paramecium*, las gamonas se encuentran ligadas a la superficie celular y provocan sus respuestas cuando el ciliado establece contacto físico.

Durante la conjugación dos ciliados se alinean uno junto al otro. El macronúcleo, que no juega ningún papel en el proceso, se desintegra. Se llevan a cabo una serie de divisiones nucleares de los micronúcleos en cada ciliado, incluyendo una meiosis, durante la cual se producen una serie de micronúcleos haploides (núcleo germinal). Todos menos uno de estos micronúcleos haploides (pronúcleos) se desintegran, y el resto de ellos en cada célula se dividen por mitosis en dos núcleos haploides (núcleos gaméticos). Se forma un puente citoplasmático entre los dos ciliados, y un núcleo gamético de cada célula pasa a la otra célula. Los dos núcleos gaméticos en cada célula se unen, restaurando así el número diploide de cromosomas. Los micronúcleos se someten a dos divisiones mitóticas para producir cuatro micronúcleos, dos de los cuales serán los nuevos micronúcleos de la célula, mientras que los otros dos están destinados a convertirse en el macronúcleo. El número de micronúcleos y macronúcleos formados dependen de la especie y se mantiene su número original.

La conjugación puede producirse entre células morfológicamente similares (conjugación isomorfa) o diferentes (conjugación anisomorfa: macro y microconjugantes) y el proceso puede dar lugar a dos cigotos (bicigótica o temporal o parcial) o a un solo cigoto (monocigótica). La conjugación isomorfa bicigótica es la más común (Miyake, 1996).

3.2.2. Morfogénesis en ciliados

La morfogénesis de los ciliados ocurre comúnmente en la reproducción asexual, durante la cual se forman partes bucales nuevas y la región somática de la célula madre se subdivide para la progenie: estos dos procesos han sido designados estomatogénesis cortical y somatogénesis, respectivamente (Lynn y Corliss, 1991). Small (1967) reconoció varios patrones de estomatogénesis entre

los hymenostomas y estableció el orden Scuticociliatida (Small, 1967) sobre estos fundamentos.

El primer paso visible en la estomatogénesis es la producción de nuevos cinetosomas en una región específica de la corteza, que se agrupan para formar el primordio oral. Posteriormente, todos los componentes orales se completan y ensamblan siguiendo el patrón específico de cada ciliado. En todos los patrones estomatogénicos el citostoma, se desarrolla al concluir la estomatogénesis, una vez que el aparato bucal ha alcanzado su posición final en el ciliado.

Los ciliados presentan diferencias tanto en el origen de los cinetosomas como en el desarrollo de la estomatogénesis (Díaz *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004; Agatha y Riedel-Lorjé, 2006; Ma *et al.*, 2006). Corliss (1979) estudió los distintos tipos de estomatogénesis encontrados en ciliados y los agrupó en cuatro tipos: telocinetal, paracinetal, bucocinetal y apocinetal (en un orden que indica más o menos una secuencia evolutiva de “más primitivo” a “más avanzado”). Estos patrones estomatogénicos se distinguen en base a cómo los nuevos orgánulos orales se forman a partir de las estructuras orales parentales: el patrón telocinetal es el presunto estado primitivo (Corliss, 1979) en el que las nuevas cinetias orales se desarrollan a partir de los extremos de las cinetias somáticas hijas; la estomatogénesis bucocinetal envuelve la formación a partir de las cinetias orales parentales, la paracinetal implica la participación de las cinetias somáticas post-orales (generalmente en la mitad del cuerpo) y en la estomatogénesis apocinetal las estructuras parentales se forman *de novo*, sin asociación de ninguna cinetia parental. Numerosas variaciones de los cuatro tipos principales de estomatogénesis fueron observadas posteriormente, y descritas como una serie de subtipos, formalizados por Foissner (1996), que añadió además otro tipo principal, el mixocinetal, en el que las cinetias orales y somáticas contribuyen a la formación de las cinetias orales hijas. Foissner (1996) revisó los conocimientos existentes sobre estomatogénesis en todas las clases de ciliados y construyó un cladograma sobre la base de los caracteres ontogenéticos.

El patrón general de estomatogénesis es muy similar entre todos los escuticociliados (Small, 1967; Ma *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008; Dragesco *et al.*, 1995; Ma y Song, 2003; Ma *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005) y se encuadra en el tipo bucocinetal (Corliss, 1964; Foissner, 1996).

3.3. Sistemática de los ciliados

La historia de la sistemática de los ciliados empieza con la *Edad del Descubrimiento* (1880-1930), dominada por las técnicas citológicas para la observación y la tinción de ciliados. Sin embargo, la innovación de las técnicas de "plata" de Klein (1926), Chatton y Lwoff (1930) y Gelei y Horváth (1931) fueron los principales adelantos técnicos que caracterizaron el segundo período importante, la *Edad de la Explotación* (1924-1950), que dio paso al tercer período, la *Edad de la Infraciliatura* (1950-1963), en la que la clasificación se basó en el reconocimiento de la infraciliación somática y oral y de sus estructuras fibrilares asociadas (Corliss, 1979). En 1963, Pitelka estableció la microscopía electrónica como la técnica "moderna" y comenzó la *Edad de la Ultraestructura* (1963-1985). El período actual podría llamarse la *Edad del Refinamiento* (1985-actualidad) (Greenwood *et al.*, 1991b), y se caracteriza por el uso de técnicas computacionales para analizar los rasgos morfológicos (Corliss 1994; Lipscomb y Riordan, 1990; Lynn, 1979; de Puytorac *et al.*, 1994) y las secuencias de ácidos nucleicos (Baroin *et al.*, 1988; Greenwood *et al.*, 1991a, 1991b; Lynn y Sogin, 1988; Schlegel *et al.*, 1991).

El filo Ciliophora (Doflein, 1901) consta actualmente de unas 8000 especies conocidas, aunque se ha estimado un número potencial de especies de alrededor de 30000 (Adl *et al.*, 2007). Las principales características que hacen de este un grupo monofilético son el dimorfismo nuclear, la estructura de la corteza y la reproducción sexual mediante conjugación.

Se han propuesto varios sistemas de clasificación diferentes para los Ciliophora utilizando las características morfológicas (Adl *et al.*, 2005; Corliss, 1974, 1979; de Puytorac *et al.*, 1984; Jankowski, 1985; Lynn y Small, 2002; Small y Lynn, 1985), y la mayoría reflejan la interpretación intuitiva de los rasgos

morfológicos ancestrales. Sin embargo, los esquemas más recientes han considerado las relaciones reveladas por los marcadores moleculares (Schmidt *et al.*, 2007; Snoeyenbos *et al.*, 2004; Stechmann *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1997).

La clase Oligohymenophorea (de Puytorac, 1974) es una extensa clase del filo Ciliophora, cuyos integrantes presentan típicamente un surco ventral que contiene la boca y unos cilios orales distintivos, separados de los cilios corporales. Los primeros incluyen una membrana paraoral a la derecha de la boca y unas membranelas, usualmente en número de tres, a su izquierda. La citofaringe es sencilla y nunca forma los *cyrtos* complejos encontrados en otras clases. Los cilios corporales se originan generalmente de monocinetias, teniendo las dicinetias una distribución limitada a una parte del cuerpo. Aunque se han utilizado datos moleculares para confirmar la relación entre los grupos de ciliados, la filogenia molecular de la clase Oligohymenophorea está incompleta y las relaciones dentro de las subclases de ciliados que contiene y entre taxones polimórficos dentro de ellas no están bien resueltas. En base a datos estructurales y moleculares, Adl *et al.* (2005) realizaron la siguiente clasificación jerárquica de los ciliados:

Biota

Eukaryota Chatton, 1925

Chromalveolata Adl y col., 2005

Alveolata Cavalier-Smith, 1991

Ciliophora Doflein, 1901

Postciliodesmatophora Gerassimova y Seravin, 1976

Karyorelictea Corliss, 1974

Heterotrichea Stein, 1859

Intramacronucleata Lynn, 1996

Spirotrichea Bütschli, 1889

Armophorea Jankowski, 1964

Litostomatea Small y Lynn, 1981

Phyllopharyngea de Puytorac y col., 1974

Nassophorea Small y Lynn, 1981

Colpodea Small y Lynn, 1981

Prostomatea Schewiakoff, 1986

Plagiopylea Small y Lynn, 1985

Oligohymenophorea de Puytorac y col., 1974

Peniculia Fauré-Fremiet en Corliss, 1956

Scuticociliatia Small, 1967

Hymenostomatia Delage y Hérouard, 1896

Apostomatia Chatton y Lwoff, 1928

Peritrichia Stein, 1859

Astomatia Schewiakoff, 1896

3.4. Los escuticociliados

Small (1967) propuso el orden Scuticociliatida que incluía los subórdenes Pleuronematina, Pseudocohnilembina y Philasterina. Posteriores revisiones del filo Ciliophora (Lynn y Small, 2002) concedieron a los escuticociliados el nivel de subclase (Scuticociliatia), y el suborden Philasterina se elevó a orden (Philasterida). Debido a que los criterios que se han utilizado para clasificar las familias, géneros y especies de escuticociliados han sido variables, la taxonomía de estos organismos es actualmente bastante confusa.

Este grupo incluye probablemente los ciliados más ubicuos de todos, por dos características esenciales: (1) su capacidad para formar poblaciones muy numerosas en poco tiempo y (2) su capacidad de dispersarse fácilmente, mediante quistes de resistencias u otros medios (Fenchel, 1993; Finlay, 1997).

Los miembros de este taxon presentan una serie de características morfológicas generales comunes. Son alargados en mayor o menor grado y presentan un macronúcleo y un micronúcleo. La ciliatura somática está constituida por cinetias polares formadas por cinétidas y su aparato bucal está constituido por 3 membranelas (policinétidas orales) y una membrana paraoral. Poseen un citopigio, una vacuola contráctil con su poro y un cilio caudal, y también es común la presencia de la escutica y de un meridiano-director no ciliado. Estas características sufren variaciones entre los diferentes géneros y especies de este taxon, las cuales no son lo suficientemente significativas como para hacer que los organismos dejen de pertenecer a los escuticociliados.

Los escuticociliados son considerados carroñeros que se alimentan de materia particulada en suspensión (bacterias, microalgas, protozoos, etc.) y, bajo ciertas circunstancias, pueden comportarse como parásitos oportunistas histiófagos que causan escuticociliatosis en especies cultivadas como es el caso de *Philasterides dicentrarchi* en el rodaballo (Dyková y Figueras 1994, Iglesias *et al.* 2001), lubina *Dicentrarchus labrax* (Dragesco *et al.*, 1995), lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* (Kim *et al.*, 2004a) y dragón marino *Phyllopteryx taeniolatus* (Rossteuscher *et al.*, 2008); *Miamiensis avidus* en lenguado japonés (Yoshinaga y Nakazoe, 1993; Jee *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2003) y caballito de mar *Hippocampus*

erectus (Thompson y Moewus, 1964); *Pseudocohnilembus persalinus* en lenguado japonés (Kim *et al.*, 2004b); *Uronema nigricans* en atún de aleta azul *Thunnus maccoyi* (Munday *et al.*, 1997), *Uronema marinum* en rodaballo (Sterud *et al.*, 2000) y lenguado japonés (Jee *et al.*, 2001) y otras especies del género *Uronema* en palometa plateada *Pampus argenteus* (Azad *et al.*, 2007); *Anophryoides haemophila* en langosta americana *Homarus americanus* (Cawthorn *et al.*, 1996); *Mesanophrys pugettensis* en el cangrejo *Cancer magister* (Morado *et al.*, 1999), *Mesanophrys chesapeakeensis* en cangrejo azul *Callinectes sapidus* (Messick y Small, 1996).

4. EL PARASITISMO

El parasitismo es una de las formas de vida de más éxito (Poulin y Morand, 2000), y es la razón por la que la diversidad de los parásitos es superior a la de los organismos no parasitarios. Los parásitos de peces son un grupo muy diverso, cuyo número se estima en alrededor de 100.000 tan sólo en peces marinos (Rohde, 2002). El éxito de este estilo de vida está en gran medida asociado a los múltiples métodos para evitar el reconocimiento inmunológico, que garantizan la proliferación, supervivencia y persistencia del parásito en el hospedador, y la evasión de la muerte del hospedador como consecuencia de los efectos letales de la respuesta inflamatoria producida por el patógeno.

4.1. Estrategias adoptadas por el parásito

Los parásitos desarrollan mecanismos para evitar la respuesta inmune del hospedador, y los hospedadores responden desarrollando modos de contrarrestar estas estrategias evasivas (Sitjà-Bobadilla, 2008). Los principales mecanismos de evasión inmune empleados por los parásitos se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a) AISLAMIENTO DE LOS PARÁSITOS: los parásitos se desarrollan en tejidos inmunoprivilegiados del hospedador, como el sistema nervioso central, la cámara anterior del ojo, el útero y los testículos, entre otros (Simpson, 2006), donde las barreras del hospedador previenen o limitan la respuesta inmune.

- b) SECUESTRO ANATÓMICO EN EL HOSPEDADOR: los parásitos son encapsulados por la respuesta inmunitaria celular sin que ésta los mate, y así pueden existir en una fase durmiente hasta que alcanzan otro hospedador (Bruschi, 1999; Else, 2005).
- c) DISFRAZ INTRACELULAR: Los parásitos se esconden dentro de macrófagos (Vannier-Santos *et al.*, 2002; Ouaissi y Ouaissi, 2005; Denkers y Butcher, 2005), desarrollando diferentes estrategias para escapar a la destrucción intracelular.
- d) MIGRACIÓN PARASITARIA, Y ESTRATEGIAS AMBIENTALES Y DE COMPORTAMIENTO: los parásitos migran hacia lugares del hospedador en los que la respuesta inmune aún no se ha alcanzado, o donde todavía no es lo suficientemente fuerte como para matarlos (Buchman *et al.*, 2001), o acomodan sus ciclos vitales a la temporada (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993) o edad (Zapata *et al.*, 2006) en la que el estado del sistema inmune del huésped está poco regulado.
- e) ESTRATEGIAS BASADAS EN LOS ANTÍGENOS como el mimetismo o enmascaramiento antigénico, variación antigénica, intercambio antigénico o pérdida antigénica. La variación antigénica implica el cambio entre miembros de una familia de multigenes, y envuelve complicados mecanismos de activación y silenciamiento (Craig y Scherf, 2003). El enmascaramiento antigénico ocurre mediante la adquisición de moléculas del hospedador y su posterior incorporación a la superficie del parásito (Buchmann y Lindenstrøm, 2002; Fletcher *et al.*, 1980; McArthur y Sengupta, 1982).
- f) MECANISMOS ANTI-INMUNES: permiten a los parásitos resistir a los factores humorales y/o celulares, neutralizando los anticuerpos del hospedador (Buchmann *et al.*, 2001), eliminando las especies reactivas del oxígeno dentro de los macrófagos (Mauel, 1984; Leid *et al.*, 1987) o evitando la actividad del complemento (Buchmann y Lindenstrøm, 2002; Plouffe y Belosevic, 2004).

- g) INMUNODEPRESIÓN o INMUNOSUPRESIÓN: los parásitos suprimen los sistemas inmunológicos de los peces mediante la reducción de la capacidad proliferativa de los linfocitos (Densmore *et al.*, 2004; Wongtavatchai *et al.*, 1995) o de la actividad fagocítica de los macrófagos (Mustafa *et al.*, 2000; Karagouni *et al.*, 2005; Scharsack *et al.*, 2004), la inducción de la apoptosis en los leucocitos del hospedador (Paramá *et al.*, 2007b), o el agotamiento de los factores innatos humores (Sitjà-Bobadilla, 2008).
- h) INMUNOMODULACIÓN: los parásitos segregan o excretan sustancias que modulan la secreción de factores inmunes del hospedador, como las citocinas, en su propio beneficio (Kamal y Khalifa, 2006).
- i) DESARROLLO RÁPIDO: los parásitos proliferan más rápido que la capacidad del hospedador para montar una respuesta de defensa (Wiegertjes, 1995; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2006; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2008).
- j) EXPLOTACIÓN DE LA REACCIÓN INMUNE DEL HOSPEDADOR para el propio beneficio del parásito.

El conocimiento de las estrategias de evasión adoptadas por los parásitos nos ayudará a comprender las interacciones hospedador-parásito y por lo tanto puede ayudar en el descubrimiento de nuevos agentes de inmunoterapia o vacunas específicas, y permitir la selección de cepas resistentes del hospedador.

4.2 Estrategias adoptadas por el hospedador

En los peces ha sido demostrada la existencia de respuestas de protección frente a los parásitos, tanto en infecciones naturales como en estudios de inmunización, pero la mayor parte de la información sobre los mecanismos implicados en la protección trata sobre la producción de anticuerpos específicos, cuyos niveles no siempre están correlacionados con la protección, y sobre la participación de otros componentes humores como el complemento (Álvarez-Pellitero, 2008), aunque la participación exacta de los mecanismos inmunitarios en la protección frente a parásitos es todavía poco conocida.

La respuesta inmunitaria innata, en especial el complemento y las células naturales citotóxicas son los mecanismos más importantes frente a los parásitos (Holland y Lambris, 2002; Boshra *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006; Chistiakov *et al.*, 2007). También son importantes los anticuerpos, con su actividad aglutinante e inmovilizante (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2006; Joerink *et al.*, 2007), y el complejo mayor de histocompatibilidad (Wiegertjes *et al.*, 2005). La participación celular de granulocitos, macrófagos y linfocitos también se ha observado durante las infecciones (Buchmann *et al.*, 2001; Jee *et al.*, 2001; Padrós *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2007), así como una elevada expresión de citoquinas y enzimas como la iNOS y la arginasa

5. EL PARÁSITO HISTIÓFAGO *Philasterides dicentrarchi*

La escuticociliatosis causada por el ciliado *P. dicentrarchi* ha sido descrita en rodaballo (Iglesias *et al.*, 2001), lenguado japonés (Kim *et al.*, 2004a), lubina (Dragesco *et al.*, 1995) y caballitos de mar (Rossteuscher *et al.*, 2008).

5.1. Morfología

Los ciliados son alargados y fusiformes, con un extremo anterior puntiagudo y un extremo posterior redondeado, una vacuola contráctil posterior y un cilio caudal más largo que los cilios somáticos en el polo antiapical (Iglesias *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004a).

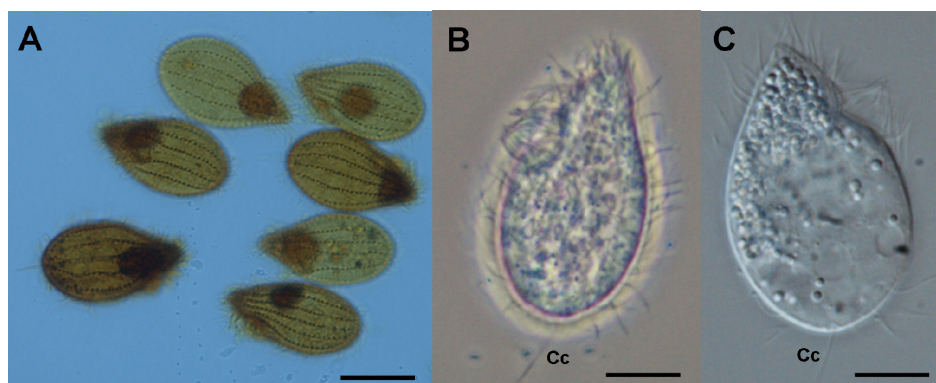


Figura 7. Imágenes de especímenes de la especie *P. dicentrarchi* impregnados con carbonato de plata (A) y fijados con formol (B y C), en las que se puede observar la forma fusiforme de los ciliados, así como el cilio caudal (Cc) y la ciliatura oral.

La ciliatura somática está constituida por 13-14 cinetias bipolares (formadas por 24- 36 cinétidas) que son dicinétidas en las 2/3 partes anteriores del cuerpo y monocinétidas en el resto. Entre la primera y la última cinetia se localiza un meridiano-director no ciliado, que comienza justo posteriormente a la escutica (4 a 6 cinétidas no ciliadas) y se fusiona con la primera cinetia en el extremo posterior. El citoprocto se localiza en el extremo subterminal de este meridiano-director.

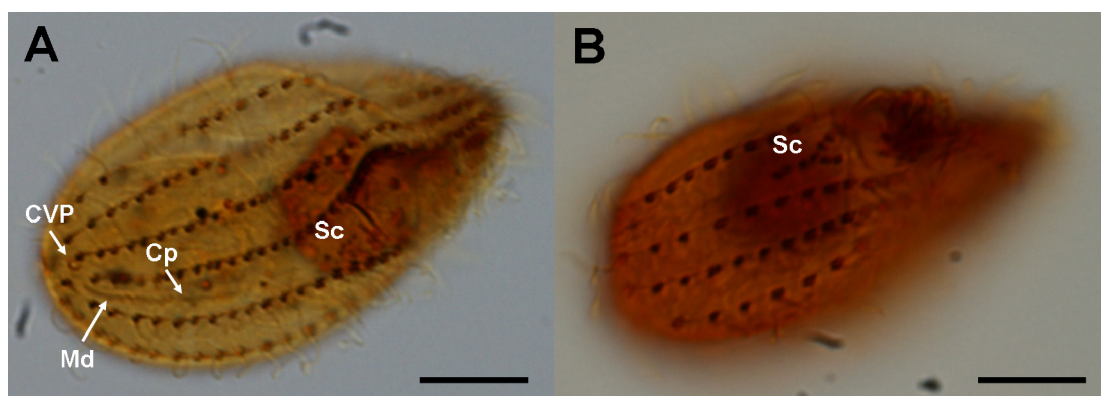


Figura 8. Imágenes de especímenes de la especie *P. dicentrarchi* impregnados con carbonato de plata, en las que se pueden observar el meridiano director (Md), el citoprocto (Cp) y la escutica (Sc), así como el poro de la vacuola contráctil (CVP), localizado al final de la segunda cinetia somática. Barra = 10 μ m.

En el extremo posterior del cuerpo, una fibra circular polar conecta todos las cinetias excepto la última, circundando el complejo cuerpo-basal polar. En el extremo posterior se observa un cilio caudal central, y todas las cinetias excepto la última emergen de una línea argentofílica, que continúa desde la última cinetia, pasando a través del complejo del cilio caudal, y contacta con la fibra circular polar a nivel de las cinetias 7 u 8. El poro de la vacuola contráctil se abre en el extremo posterior de la segunda cinetia.

La cavidad bucal ocupa entre la mitad y el tercio anterior del cuerpo. El aparato bucal está formado por una membrana paraoral, compuesta por dos partes (PM1 y PM2), y tres policinétidas orales (OPK1, 2 y 3). La PM1, con 8 cinetosomas dispuestos en línea recta, se inicia en el extremo anterior de la OPK2 y corre a lo largo de esta hasta que finaliza, en el extremo posterior de la OPK3. La PM2, más larga que la PM1 y constituida por múltiples cinetosomas dispuestos en línea curva, se inicia en el extremo posterior de la OPK3 hasta el

final de la cavidad bucal, rodeándola. La OPK1 es alargada y posee dos filas longitudinales de 5-6 cinetosomas, la OPK2 tiene forma trapezoidal y consta de cuatro filas longitudinales de 5-6 cinetosomas, y la OPK3 es ancha y corta, ligeramente curva, con 1-2 filas transversales de cinetosomas.

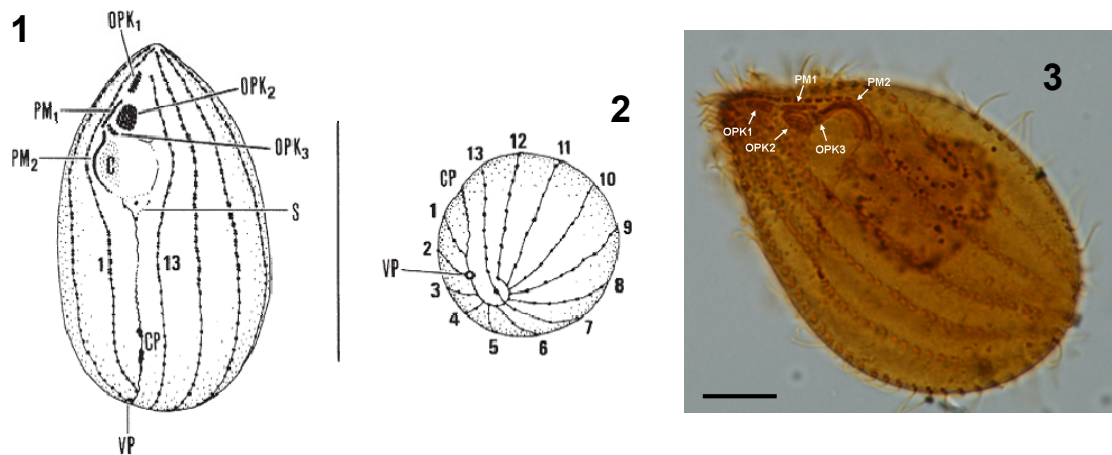


Figura 9. (1 y 2) Dibujos esquemáticos de un ciliado de la especie *P. dicentrarchi*, en el que se muestran la ciliatura oral y somática (1), así como la infraciliatura y las líneas argentofilicas en el extremo posterior del ciliado, con las cinetias numeradas del 1 al 13 (Extraído de Iglesias *et al.*, 2001). (3) Imagen de un individuo de la especie *P. dicentrarchi* impregnado con carbonato de plata, mostrando el aparato bucal. El aparato oral está compuesto por dos membranas paraorales (PM1,2) y tres policinétidas orales (OPK 1,2,3), y también pueden observarse el citostoma (C), la escutica (S), el citoprocto (CP) y el poro de la vacuola contráctil (VP). Barra=10μm.

Los ciliados poseen un macronúcleo globular de mayor tamaño y un micronúcleo asociado más pequeño, situados aproximadamente en la mitad de cuerpo. La división se produce generalmente por fisión homotetogénica monotómica y, bajo ciertas circunstancias, los ciliados llevan a cabo la reproducción sexual mediante conjugación. No está descrita la formación de quistes en ninguna de las fases del ciclo vital de *P. dicentrarchi*, y tampoco se ha descrito en esta especie el cambio de microstoma-macrostoma, que sí que ha sido descrito para la especie *Miamiensis avidus* (Gómez-Saladín y Small, 1993 b, c), considerada por algunos autores sinónima de *P.dicentrarchi*.

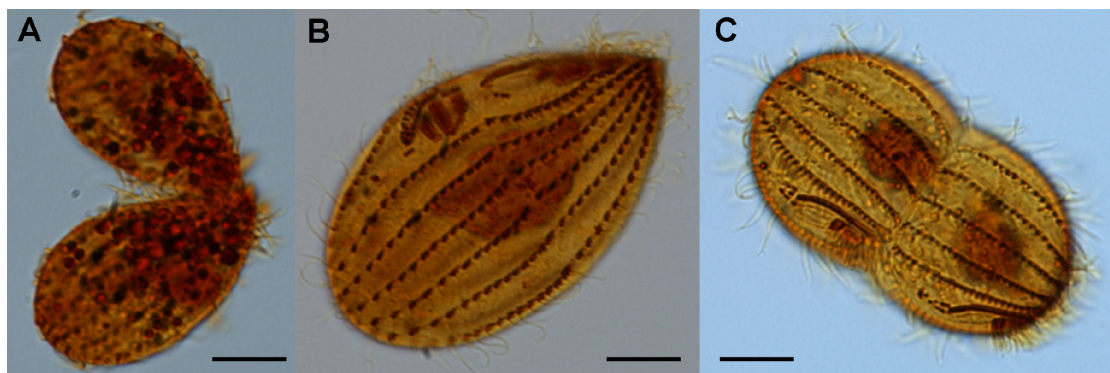


Figura 10. Imágenes de especímenes de la especie *P. dicentrarchi* impregnados con carbonato de plata en proceso de reproducción sexual por conjugación (A) y en varias fases de reproducción asexual mediante fisión binaria (B y C). Barra=10µm.

5.2. Cultivo *in vitro*

Se ha logrado obtener una gran cantidad de ciliados *in vitro* utilizando un sistema de cultivo axénico basado en el medio L-15 Leibovitz suplementado con suero fetal bovino (FBS), lípidos (lecitina y Tween80), nucleósidos y glucosa, con una salinidad del 10‰, una temperatura entre 18-23 °C y pH=7,2 (Iglesias *et al.*, 2003a). También es posible obtener altas densidades de ciliados mediante el cultivo en este mismo medio de cultivo con adición de tejidos de rodaballo autoclavados y FBS inactivado por calor (Castro *et al.*, 2007).

5.3. Patología

P. dicentrarchi es un endoparásito altamente virulento que se divide rápidamente por fisión binaria y, bajo determinadas condiciones, aún desconocidas, penetra en el cuerpo del hospedador y migra vía torrente sanguíneo y tejidos conectivos hasta alcanzar varios órganos y tejidos, provocando generalmente la muerte del hospedador.

5.3.1. Signos clínicos de la infección

Las infecciones por ciliados histiófagos en rodaballo, lubina y dorada se caracterizan por un rápido desarrollo y distribución sistémica a órganos como la dermis, musculatura, branquias, hígado, tubo digestivo, bazo, riñón, corazón

y sistema nervioso central (Padrós *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2009; Moustafa *et al.*, 2010).

Los peces afectados muestran ulceraciones cutáneas hemorrágicas que se extienden a la musculatura, oscurecimiento cutáneo y de las branquias, alteración en la natación, exoftalmia uni- o bilateral, podredumbre de las aletas y la cola y distensión abdominal causada por la acumulación de fluido ascítico en la cavidad corporal, lo que indica la existencia de una importante respuesta inflamatoria (Padrós *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2009; Moustafa *et al.*, 2010). También se observa necrosis del músculo, dermis, epidermis y branquias, así como hiperplasia branquial, miolisis y encefalitis, presentando los peces en ocasiones anemia (Ramos *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2009).

5.3.2. Vías de entrada al hospedador

Las rutas por las que *P. dicentrarchi* penetra en el hospedador no están todavía claras. En un estudio de infección experimental en rodaballo con este parásito, las rutas de infección oral, nasal y rectal no resultaron efectivas (Paramá *et al.*, 2003). La infección experimental por la vía rectal y por vía oral también resultó infructuosa en un estudio realizado con este parásito en lubina (Dragesco *et al.*, 1995). Sin embargo, la infección natural mediante la vía oral se ha sugerido para un escuticociliado no identificado del rodaballo (Dyková y Figueras, 1994), en vista de la presencia de ciliados en el tejido conectivo subepitelial del tracto digestivo. En el caso de *P. dicentrarchi*, la vía oral de infección parece improbable, ya que este ciliado no sobrevive a pH ácido (Iglesias *et al.*, 2003a).

La inmersión durante 24-48 horas no tuvo efecto sin abrasión previa de las branquias y del opérculo, aunque se obtuvieron infecciones efectivas tras la inmersión con abrasión previa de las branquias y del opérculo (Paramá *et al.*, 2003) o de las branquias y el músculo (Jin *et al.*, 2009) y mediante inyección intraperitoneal y periorbital (Paramá *et al.*, 2003). Sin embargo, Jung *et al.* (2007) lograron infectar lenguados japoneses con *Miamiensis avidus* mediante inmersión, sugiriendo las branquias y la piel como la vía de entrada en las

infecciones naturales, hipótesis soportada también por otros autores (Jin *et al.*, 2009).

Las propiedades quimioatrayentes de los componentes del suero sanguíneo del rodaballo para los trofozoítos de *P. dicentrarchi*, y las respuestas quimiotácticas a ellos pueden jugar un papel importante en la invasión de los tejidos del hospedador, lo que puede explicar la gran susceptibilidad de los peces con lesiones dérmicas a las infecciones por este ciliado (Paramá *et al.*, 2003). Otros autores también han sugerido que la infección natural ocurre vía lesiones (Jin *et al.*, 2009).

5.3.3. Estrategias exhibidas por los ciliados durante la infección

P. dicentrarchi induce la apoptosis en leucocitos del riñón anterior del rodaballo por medio de cistein-proteasas (Paramá *et al.*, 2007b), que provocan además un aumento en la actividad caspasa-3 y en la expresión de los niveles de IL-1b de los leucocitos del riñón anterior cultivados in vitro (Paramá *et al.*, 2007a,b). El parásito también provoca depresión del estallido oxidativo y/o alteración de la actividad fagocítica mediante el secuestro de ROS en fagocitos (Leiro *et al.*, 2004a).

Se sabe que este parásito expresa antígenos de inmovilización (i-antígenos) que podrían estar envueltos en las respuestas de protección del rodaballo (Iglesias *et al.*, 2003b). También se ha sugerido la presencia de otros antígenos de superficie, aparte de los i-antígenos (Iglesias *et al.*, 2003b; Lee y Kim, 2008a, b) que podrían participar en la protección.

P. dicentrarchi utiliza las estrategias de muda y variación antigénica para sobrevivir a las respuestas de defensa del hospedador. La utilización de la estrategia de muda antigénica explicaría la ausencia de lisis y posterior escape del parásito (Iglesias *et al.*, 2002).

Varios estudios señalaron la adquisición de resistencia a las enfermedades en los peces supervivientes a epizootias de escuticociliatosis, detectándose mediante ELISA anticuerpos específicos en los sueros de rodaballo, tanto en infecciones naturales como en peces inoculados con

diferentes formulaciones de ciliados muertos (Iglesias *et al.*, 2003b; Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008). También se obtuvo protección parcial y producción de anticuerpos específicos en lenguado japonés inmunizado con escuticociliados (Jung *et al.*, 2006).

5.4. Técnicas de diagnóstico

Generalmente, el primer paso en el diagnóstico de las patologías parasitarias consiste en la observación al microscopio óptico o electrónico de las características morfológicas del parásito a partir de raspados o improntas de tejido en fresco o teñidas. También se recurre a la histología, que permite, con ayuda de diversas tinciones, la observación del parásito en los distintos tejidos del pez, permitiéndonos conocer cómo se desarrolla la patología.

Mediante pruebas serológicas, como el ELISA, Western blot o inmunohistoquímica, entre otras, se estudian las propiedades, componentes y alteraciones del suero en condiciones normales y patológicas.

Sin embargo, en los últimos años ha cobrado una gran importancia el diagnóstico mediante PCR y técnicas derivadas, siendo este un método de detección e identificación más exacto debido a la creciente información existente en las bases de datos de secuencias nucleotídicas. Entre las técnicas derivadas de la PCR destacan: la RFLP (Polimorfismos en los tamaños de los fragmentos de restricción), utilizada en el estudio de microsporidiosis marinas (Leiro *et al.*, 2000); la RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) empleada para obtener el patrón de varias especies de escuticociliados marinos, como *Uronema marinum* (Cheung *et al.*, 1980; Sterud *et al.*, 2000; Jee *et al.*, 2001) y *Mesanothryx carcini* (Grolière y Leglise, 1977); y el uso de cebadores específicos utilizado en escuticociliados que infectan crustáceos (Ragan *et al.*, 1996).

5.5. Profilaxis y control

Existen varios factores que pueden influir en la eficacia de las medidas terapéuticas para el control de la escuticociliatosis por *P. dicentrarchi* (Iglesias *et al.*, 2002): (1) *P. dicentrarchi* es una especie altamente virulenta que se divide rápidamente y migra a través del torrente sanguíneo y los tejidos conectivos, alcanzando varios órganos y tejidos, donde se alimentan activamente de componentes tisulares. (2) Pocos agentes quimioterápicos han sido aprobados para su uso en acuicultura, lo cual limita la elección de fármacos para el tratamiento de la escuticociliatosis. (3) Algunos de los compuestos más efectivos mostraron una reducida actividad en agua de mar podría indicar que no son suficientemente efectivos en la administración por baño, y la administración oral es difícil en casos severos porque, cuando la enfermedad se encuentra en una fase avanzada, los peces como el rodaballo exhiben anorexia.

Iglesias *et al.* (2002) testaron el efecto *in vitro* de 52 antiprotozoarios frente al patógeno, y 13 de ellos resultaron efectivos (es decir, causaron la muerte de todos los ciliados tras un ensayo de 24 horas). En un orden descendiente de eficacia (dosis letal mínima de 100 a 0,8 ppm), los compuestos efectivos fueron: niclosamida, oxiclozanida, sulfóxido de bitionol, toltrazuril, N-(2'-hidroxi-5'-cloro-benzoilo) 2-cloro-4-nitroanilina, furaltadona, hiclato de doxiciclina, formalina, albendazol, carnidazol, pirimetamina, hidrocloreuro de quinacrina y sulfato de quinina. Sin embargo, el hiclato de doxiciclina y albendazol no resultaron efectivos en agua de mar, y la actividad del sulfóxido de bitionol y el toltrazuril resultó también reducida.

Uno de los compuestos más utilizados en acuicultura es la formalina. Iglesias *et al.* (2002), aunque consideran el uso de formalina inapropiado en vista de la localización endoparásita del ciliado, reconocen que los baños con formalina a bajas dosis podrían ser efectivos para eliminar las formas libres del ciliado.

Los tratamientos mediante baño con Jenoclean y peróxido de hidrógeno resultaron efectivos a bajas concentraciones (50 ppm) con un tiempo de aplicación corto, mientras que la formalina resultó sólo moderadamente efectiva a esta concentración (Jin *et al.*, 2009; Harikrishnan *et al.*, 2010).

Recientemente, ha habido un creciente interés en el uso terapéutico de polifenoles vegetales como la manguiferina, la epigallocatequina-3-galato y el resveratrol. De estos tres compuestos, sólo el resveratrol (RESV) provocó una reducción significativa en la densidad de los ciliados a 50 μ M, mientras que esta reducción sólo fue significativa para la mangiferina y la epigallocatequina a la concentración de 500 μ M (Leiro *et al.*, 2004b). El RESV tiene efectos citostáticos frente a *P. dicentrarchi*, ya que causa anormalidades metabólicas que provocan procesos de autofagia, alteración mitocondrial, reducción del volumen celular y bloqueo de la protección frente al estallido respiratorio debido a la desregulación de enzimas detoxificantes como la peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Morais *et al.*, 2009; Lamas *et al.*, 2009).

Como una posible alternativa, se ha investigado también el uso terapéutico de la β -ciclodextrina encapsulada en microesferas de quitosan, resultando este tratamiento en una eliminación total de los parásitos *in vitro* (Paramá *et al.*, 2005). La indometacina es una droga antiinflamatoria no esterooidal que inhibe la síntesis de prostaglandinas, y ha mostrado ser capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi* mediante un mecanismo relacionado con la inducción de la apoptosis (Paramá *et al.*, 2007b).

Los lenguados japoneses inyectados con oligonucleótidos sintéticos que contenían motivos CpG (CpG-ODNs) mostraron una mayor actividad escuticocida en el suero, que desaparecía si estos sueros eran inactivados por calor, lo que sugiere que estos compuestos podrían activar la vía alternativa del complemento, y aumentar la resistencia frente al parásito (Lee y Kim, 2009). En otros estudios se han sintetizado y testado nuevos antiprotozoarios frente al parásito *P. dicentrarchi*, y los más activos resultaron poseer un anillo de piperazina en su estructura química (como, por ejemplo, los reconocidos antiparasitarios niclosamida y oxiclozanida) (Quintela *et al.*, 2003).

En relación al uso de antibióticos, Jin *et al.* (2009) informaron de que los acuicultores coreanos controlan parcialmente la escuticociliatosis con la aplicación cruda de antibióticos como la oxitetraciclina, gentamicina, tetraciclina, amoxicilina y cefazolina, a pesar de que no ha sido llevado a cabo ningún estudio científico para determinar la eficacia relativa de estos tratamientos (Jin *et al.*, 2009). Por otro lado, los brotes de escuticociliatosis provocados por *P. dicentrarchi* en lubina en el Mediterráneo se controlaron de manera efectiva mediante el uso de dimetridazol (Dragesco *et al.*, 1995). Sin embargo, en el estudio realizado por Iglesias *et al.* (2002), la oxitetraciclina, amoxicilina, gentamicina y dimetridazol no resultaron efectivos contra el parásito en agua de mar.

El tratamiento químico de la escuticociliatosis presenta dificultades debidas a la naturaleza endógena del parásito, los elevados costes de la terapia, y la preocupación pública existente en cuanto a la alimentación y seguridad ambiental (Harikrishnan *et al.*, 2010). La vacunación es una posible alternativa a los tratamientos químicos y representa actualmente la vía más efectiva de control de la parasitosis producida por *P. dicentrarchi*.

Recientemente, Sanmartín *et al.* (2008) desarrollaron una vacuna inactivada frente a un aislado *P. dicentrarchi* capaz de producir una protección relativa del 77% y 66% pasados uno y cinco meses tras la segunda vacunación, respectivamente, lo que indica que la emulsión utilizada de antígeno más adyuvante oleoso induce una protección duradera contra la infección por este parásito en rodaballo cultivado. Lamas *et al.* (2008) optimizaron la formulación de esta vacuna, elevando al 100% la protección obtenida mediante una mezcla de 10^6 trofozoítos/ml, 0,2% de formalina y 50% de adyuvante (Seppic Montanide® ISA 763A). Otros autores han desarrollado una vacuna con una mezcla de tres aislados del escuticociliado de distintos orígenes, que produjo un cierto grado de protección tras el reto con uno de los aislados (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, no hay evidencia de que exista una vacuna que pueda proteger frente a diferentes aislados de *P. dicentrarchi*. Los rodaballos

vacunados con los distintos aislados mostraron diferentes niveles de protección, y la protección efectiva sólo fue alcanzada cuando se usó el mismo aislado en la vacunación y en el reto (Piazzon *et al.*, 2008).

5.6. Filogenia

En el análisis filogenético de un aislado de *Philasterides dicentrarchi* obtenido de rodaballo, utilizando un fragmento de 350 pb de la subunidad 18S del ARNr, las mayores identidades nucleotídicas fueron observadas con las especies aisladas del lenguado japonés llamadas *Miamiensis avidus* (99%) y *Philasterides dicentrarchi* (98%), mientras que las menores identidades nucleotídicas se observaron con *Entodiscus borealis* (85%) y *Uronema marinum* (86%) (Paramá *et al.*, 2006).

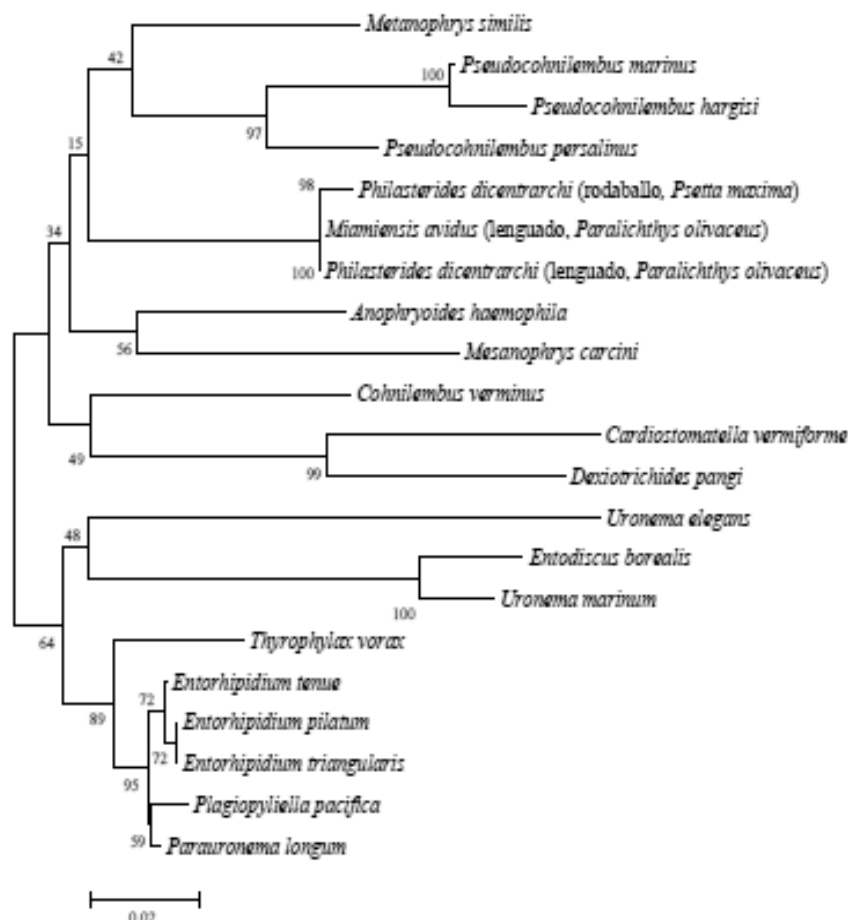


Figura 11. Relaciones filogenéticas de diversas especies del orden Philasterida inferidas a partir del análisis de secuencias del gen SSUrRNA mediante el método de neighbour-joining. En cada nodo se indican los valores de bootstrap para 1000 réplicas, y la barra de escala indica una distancia de 0,02 (Extraído de Paramá *et al.*, 2006).

La asignación de los distintos géneros dentro de las familias del orden Scuticociliatia ha sido y es controvertida, ya que no han sido presentados criterios generalmente aceptables para ellos (Corliss, 1979; de Puytorac, 1994; Lynn y Small, 2002; Ma *et al.*, 2005; Lynn, 2008). En base a los patrones estomatogenéticos, los datos de caracteres apomórficos y plesiomórficos y los caracteres morfológicos, Ma *et al.* (2005) asignaron *Philaster* y *Philasterides* a dos familias diferentes, Philasteridae y Uronematidae, respectivamente. Sin embargo, en base a su morfología similar, especialmente la estructura “similar” del aparato bucal (por ejemplo, las membranelas 1 y 2 dominantes), estos dos géneros han sido colocados dentro de la misma familia Philasteridae por otros investigadores (Corliss, 1979; de Puytorac, 1994; Lynn y Small, 2002; Lynn, 2008).

Además, ha sido propuesta una sinonimia entre las especies *Philasterides dicentrarchi* y *Miamiensis avidus*, basándose en caracteres morfológicos (Song y Wilbert, 2000; Jung *et al.*, 2007) y en la secuencia genética de la subunidad ARNr 18S (Jung *et al.*, 2007; Paramá *et al.*, 2006).

Se han descrito 3 especies dentro del género *Philasterides*: *P. armata*, *P. armatalis* y *P. dicentrarchi*. Recientemente, se ha informado de que el nombre del ciliado enviado al GenBank (Kim *et al.*, 2004a) ha sido cambiado de *Philasterides dicentrarchi* a *Miamiensis avidus*, debido a los resultados de un estudio que analiza las 3 morfoespecies del género *Philasterides* y concluye que entre *P. armatalis* y *P. dicentrarchi* hay una identidad de secuencias de un 94,5%, siendo esta identidad de un 99,8% entre *P. dicentrarchi* y *M. avidus* (Gao *et al.*, 2010).

6. DETERMINACIÓN DE ESPECIES Y CEPAS EN CILIADOS

6.1. El concepto de “especie” en ciliados

La determinación de especies ha sido y es un tema controvertido. La riqueza morfológica de los ciliados se expresa en las aproximadamente 8000 especies de ciliados descritos (Paulin, 1996), de los cuales unos 4300 son de vida libre (Finlay *et al.*, 1996). Según algunos autores, esta cifra es menor, y estiman que el número aproximado de especies de ciliados de vida libre es de unos 3000

(Finlay *et al.*, 1996). La razón principal de esta diferencia en el número de especies es la falta de una definición clara y concreta del concepto de especie en ciliados.

Algunos de los problemas de la determinación de especies se derivan del escaso número de células analizadas para la descripción, aunque el mayor número de especies sinónimas se ha generado con la utilización de las técnicas de impregnación argéntica, ya que a menudo la descripción se ha basado únicamente en ciliados impregnados, sin tener en cuenta las características del ciliado en vivo. Del mismo modo, las descripciones no pueden basarse sólo en observaciones del ciliado en vivo.

Existen dos tendencias en el campo de la taxonomía de los ciliados: los taxónomos “separadores”, que utilizan las diferencias más mínimas, como pequeñas diferencias en la infraciliatura y el tamaño de las células para crear una nueva especie, y los taxónomos “unificadores”, que estiman que puede existir una amplia variación dentro de los individuos de una especie (variación intraespecífica).

Recientemente, intentando solucionar este problema, Finlay *et al.* (1996) han establecido el concepto de **morfoespecie**, basado en la idea de que los ciliados muestran gran diversidad de formas (pleomorfismo), y la forma y función están claramente correlacionadas, por lo que las morfoespecies pueden ser definidas en términos de límites específicos para sus características morfológicas. Una morfoespecie puede contener distintas especies “hermanas”. La morfoespecie permite determinar diferentes cepas utilizando técnicas moleculares, pero si estas cepas no pueden ser relacionadas con características específicas de forma y función, no hay justificación para denominar las cepas como especies.

Otro concepto, acuñado desde el campo de la microbiología, es el de los **ecotipos**, que son como poblaciones ecológicamente distintas sujetas a sus propios eventos particulares de selección periódica, definición que nos permite identificar a los ecotipos como agrupaciones basadas en la identidad de secuencias de ADN (Ward *et al.*, 2008). Los ecotipos también podrían ser

considerados como especies con un concepto ecológico de especie (Ward, 2006). Las morfoespecies pueden hospedar múltiples ecotipos fenotípicamente plásticos (Finlay *et al.*, 2006) y el reto actual está en determinar qué nivel de un (sub)*cluster* (subgrupo), si es alguno, le corresponde a los ecotipos (Palys *et al.*, 1997; Cohan, 2002) y descubrir si hay alguna correspondencia entre los grupos de secuencias de ADN, los ecotipos y las morfoespecies (Dini y Nyberg, 1999; Foissner *et al.*, 2001; Finlay, 2004; Boenigk *et al.*, 2005). Genomas de diferentes ecotipos pueden diferir en los *sets* de genes de transferencia horizontal: algunos de esos genes podrían conferir singularidades ecológicas y definir un ecotipo, mientras que otros podrían representar cambios neutrales sin significación ecológica, y los genomas del mismo ecotipo deberían diferir sólo en el último set de genes (Cohan, 2006).

También es común referirse a los subgrupos dentro de una especie como **serotipos**, determinados por diferencias en los patrones polipeptídicos ante distintos anticuerpos, aunque en ocasiones no está claro si este concepto corresponde a cepas o a subespecies dentro de una especie.

Sin embargo, el enfoque genético, más riguroso, es el más demandado y el más respetado actualmente, y se habla entonces de **genotipos** o **ribotipos**, según el tipo de marcador genético utilizado.

6.2. Técnicas utilizadas en la determinación de especies

Las técnicas convencionales de investigación, como los estudios morfológicos basados en análisis de microscopía óptica y electrónica, los estudios de comportamiento, los ensayos de emparejamiento con cepas vivas etc., han sido el fundamento en el que se ha basado tradicionalmente la identificación y sistemática de los ciliados (Chen *et al.*, 2000). El análisis de las líneas de plata en individuos impregnados con plata es un método fiable que se sigue empleando en la actualidad para hacer investigaciones sistemáticas y morfogenéticas mediante microscopía óptica (Lin *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2007) y microscopía electrónica de transmisión (Cameron y O'Donoghue, 2002; Kornilova *et al.*, 2006; Modeo *et al.*, 2006).

Sin embargo, muchas especies morfológicas son realmente especies hermanas o grupos de especies crípticas (Curds, 1985). Estos grupos de especies hermanas ahora pueden identificarse utilizando técnicas bioquímicas y moleculares de isoenzimas y secuencias de ácidos nucleicos. La introducción de estas técnicas ha ayudado a resolver algunos de los problemas sistemáticos dentro del filo Ciliophora, particularmente con respecto a la separación de especies y la reconstrucción de sus relaciones filogenéticas (Paiva *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009).

Desde la introducción de la PCR (Mullis *et al.*, 1986), la electroforesis en gel ha sido ampliamente utilizada para separar los productos de PCR y determinar su presencia, intensidad, tamaño y patrón a través de la visualización con diferentes tinciones. La aplicación de las técnicas de PCR a los estudios filogenéticos de ciliados ofrece la oportunidad de adquirir información adicional a partir de secuencias moleculares. Sin embargo, los estudios de diversidad genética intraespecífica en ciliados están particularmente obstaculizados por la falta de marcadores de ADN apropiados (Gentekaki y Lynn, 2009). Hasta el momento, se han utilizado fragmentos de ADN de algunos genes como la subunidad pequeña del rRNA (SSrRNA) (Sogin *et al.*, 1986; Lynn y Sogin, 1988), histonas (Bernhard y Schlegel, 1998), proteínas de shock térmico Hsp 70 (Budin y Philippe, 1998), secuencias de la ADN polimerasa (Hoffman y Prescott, 1997) o regiones ITS2 (Coleman, 2003), entre otras, para construir los árboles filogenéticos de alrededor de 230 protistas ciliados. La caracterización de diferentes isozimas es otro de los métodos usados para diferenciar especies y cepas de ciliados (Valbonesi y Luporini, 1988).

En base a la amplificación del ADN, se pueden realizar diferentes técnicas para la identificación de los escuticociliados, como por ejemplo:

- **RAPD.** Los fragmentos de ADN obtenidos por medio de esta técnica se amplifican en regiones aleatorias del genoma ya que los cebadores son secuencias arbitrarias de ADN sintético (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). La RAPD es un método simple que no necesita el

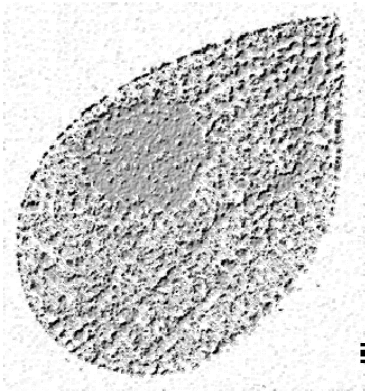
conocimiento previo de secuencias de ADN, y nos permite analizar una gran variedad de lugares del genoma simultáneamente, mostrándose las diferencias existentes entre las cepas o especies.

- **PCR-RFLP.** La técnica RFLP consiste en la digestión con enzimas de restricción de los amplicones de la PCR, que generará distintos patrones de fragmentos si existe variación en las secuencias nucleotídicas digeridas, y la posterior visualización mediante electroforesis en gel de los patrones obtenidos.
- **PCR-multiplex.** Los productos obtenidos de la amplificación del ADN de cada especie por este método son diferentes para cada una de ellas, lo que permite distinguirlas de una forma rápida y sencilla, incluso en el caso de hospedadores infectados simultáneamente por varias especies. Kim y col. (2004b) basándose en la comparación de la secuencia del gen SSUrRNA de varios escuticociliados, seleccionaron 3 regiones hipervariables para la construcción de los cebadores de la PCR utilizados en la amplificación específica de segmentos del gen SSUrRNA de las especies examinadas.
- **PCR en tiempo real.** La PCR en tiempo real es una variante de la PCR utilizada para amplificar y cuantificar simultáneamente de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN. Se ha utilizado en infecciones producidas por *Ichthyophthirius multifiliis* (Jousson *et al.*, 2005).

Mediante la **serología**, se estudian las propiedades, componentes y alteraciones del suero en condiciones normales y patológicas. Las pruebas serológicas incluyen, por ejemplo, el ELISA y la separación electroforética de los patrones polipeptídicos seguida de un Western blot. Mediante el uso del Western blot, se pueden llegar a determinar distintos serotipos dentro de una misma especie en función de las diferencias en sus patrones polipeptídicos. Sin embargo, todas estas técnicas varían en especificidad y sensibilidad, lo que hace

que a veces sean difíciles de interpretar, siendo el antígeno el componente con mayor influencia en la especificidad de un test.

La utilización de las técnicas computacionales multivariantes modernas supuso un gran avance, ya que posibilitan el análisis de una gran cantidad de datos, facilitando el uso de la información creciente que existe en las bases de datos de ciliados.

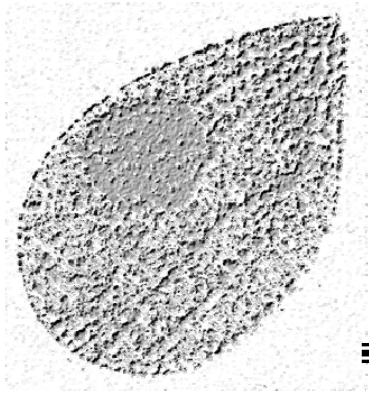


OBJETIVOS

Philasterides dicentrarchi es un parásito histiófago que provoca la escuticociliatosis en el rodaballo cultivado, entre otras especies, causando enormes pérdidas en la acuicultura. La problemática de la escuticociliatosis se ve agravada en la actualidad por la inexistencia de medidas de control efectivas y por la incapacidad de predecir y prevenir las infecciones. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una vacuna inactivada que provoca, tras su administración vía intraperitoneal, una protección muy buena y duradera frente a la infección experimental, si bien no ofrece una protección generalizada frente a todos los brotes de escuticociliatosis aparecidos en diferentes plantas de cultivo. Estos resultados parecen indicar que podemos encontrarnos ante infecciones producidas por diferentes especies de escuticociliados o por diferentes cepas del parásito, con diferencias antigénicas significativas a nivel de los antígenos protectores. Puesto que hasta el momento no existe una información veraz sobre la epidemiología de la escuticociliatosis en las piscifactorías gallegas y también se desconoce si existen varias especies/cepas de escuticociliados, es fundamental conocer y caracterizar con detalle el/los agente/s etiológico/s de esta infección en el rodaballo para desarrollar con rigor una vacuna que genere una protección global frente a esta patología.

Por tanto, en el presente estudio nos marcamos los siguientes **objetivos**:

- Investigar la posible existencia de cepas de *Philasterides dicentrarchi* mediante análisis morfológicos, ecofisiológicos, serológicos y genéticos en piscifactorías comerciales de rodaballo de Galicia y Portugal.
- Determinar la metodología más rápida y eficaz para la caracterización de aislados en brotes de escuticociliatosis.
- Caracterizar los principales antígenos del ciliado y analizar la respuesta inmunitaria y protección inducida en el rodaballo tras la infección/inmunización con los aislados.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los rodaballos (50-100g) utilizados en estos experimentos se obtuvieron de piscifactorías gallegas. Se mantuvieron en tanques de 250 litros con agua salada recirculante en constante aireación, bajo un fotoperíodo de 12 horas y se les alimentó diariamente con pellets de pienso comercial semiseco (Skretting, Burgos, España). Los peces fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio durante un mínimo de dos semanas antes del inicio de los experimentos.

Los ratones utilizados fueron hembras de 8-10 semanas de edad pertenecientes a las cepas BALB/C y SWISS-CD1, obtenidas del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de conformidad con la normativa europea sobre protección de los animales (Directiva 86/609), incluida en la Declaración de Helsinki, y todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Santiago de Compostela.

2. OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS

Los aislados del parásito ciliado *Philasterides dicentrarchi* fueron obtenidos a partir de fluido ascítico o cerebros de rodaballos infectados de manera natural en distintas piscifactorías de Galicia y Portugal. En el capítulo 6 se describe específicamente cómo se obtuvieron los aislados de *P. dicentrarchi* a partir de muestreos mensuales en una misma piscifactoría gallega.

3. CULTIVO DE LOS AISLADOS DE *Philasterides dicentrarchi*

La pertenencia de los distintos aislados a la especie *P. dicentrarchi* se confirmó en todos los casos en base a criterios morfológicos (Iglesias *et al.*, 2001; Paramá *et al.*, 2006) y genéticos (Paramá *et al.*, 2006).

Los mejores resultados de crecimiento para la especie *Philasterides dicentrarchi* se obtienen a un pH 7,2, una temperatura de 18-23 °C y una salinidad del 10‰ (Iglesias *et al.*, 2003a), por lo que éstas fueron las condiciones

de cultivo para todos los aislados del parásito, que se mantuvieron en el laboratorio a 21 °C.

3.1. Medios de cultivo

Para el mantenimiento de los parásitos en el laboratorio, así como para la realización de los diferentes ensayos, se utilizaron distintos medios de cultivo, cuya composición se detalla a continuación:

3.1.1. Medio L15 incompleto

El medio L15 (Leibovitz) con L-Glutamina (Sigma-Aldrich) se preparó según las instrucciones del fabricante, sin ningún tipo de aditivo. La esterilización se realizó por filtración (0,22 µm).

3.1.2. Medio L15 completo (10‰ salinidad, pH 7.2)

Este medio corresponde al medio descrito en Iglesias *et al.* (2003b) con alguna modificación.

El medio L15 (Leibovitz) con L-Glutamina (Sigma-Aldrich) se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante, y a continuación se añadieron 90 µg/ml de cada uno de los nucleótidos adenosina, citidina y uridina, 150 µg/ml de guanosina y 5 g/l de glucosa, tras lo que se esterilizó por filtración a 0,22 µm. La solución lipídica se preparó disolviendo en agua bidestilada 1,81 mg/ml de L- α -fosfatidilcolina y 1,81 mg/ml de Tween80, y calentando la disolución a 80 °C durante 1 h en agitación hasta su completa disolución, tras lo que se esterilizó por filtración (0,22 µm) en caliente.

Una vez esterilizados, el medio de cultivo y la solución lipídica se mezclaron. Antes de su utilización, el medio L15 completo fue suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBSi) y 1% de solución antibiótica penicilina/estreptomicina/anfotericina (PSA).

3.2. Mantenimiento de los parásitos en el laboratorio

Con el fin de estandarizar los protocolos y minimizar las diferencias debidas al manejo, el mantenimiento de los diferentes frascos de cultivo de los distintos aislados se llevó siempre en paralelo, realizando al mismo tiempo los pases de los frascos de cultivo y los pases a través del pez, con los mismos lotes de medio de cultivo, la misma temperatura,...

Puesto que los ciliados pierden virulencia cuando son cultivados *in vitro*, periódicamente cada mes, y siempre antes de la realización de cualquier experimento, se infectaron experimentalmente rodaballos con los diferentes aislados, para obtener así cultivos frescos de parásitos virulentos (Paramá *et al.*, 2003). Para esta infección, los rodaballos se inyectaron intraperitonealmente con 100 µl de una suspensión de parásitos (5×10^6 parásitos/ml) en tampón fosfato salino (PBS). Tras aproximadamente 6-7 días de infección, cuando se observó una importante acumulación de fluido ascítico en la cavidad intraperitoneal de los rodaballos, los parásitos fueron reaislados por abdominocentesis bajo condiciones asépticas en medio L-15 incompleto con un 10% de la solución PSA. Cuando los cultivos recién aislados estuvieron libres de restos celulares, se pasaron a frascos de cultivo con medio L-15 completo suplementado con 10% de FBSi y 1% de solución PSA y se mantuvieron en el laboratorio a 21 °C, realizando los pases necesarios con este mismo medio de cultivo.

4. PREPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

4.1. Preparación de los extractos totales

Para la obtención de los extractos totales de los parásitos, 2×10^6 ciliados procedentes de cultivos en fase exponencial temprana fueron lavados tres veces por centrifugación a 650g en tampón fosfato salino (PBS) a 4°C. Tras la adición de 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; disuelto en etanol 100%), los ciliados se rompieron por ultrasonidos a 4°C y se centrifugaron a $14000 \times g$ 20 minutos. El pellet se lavó entonces dos veces con PBS a 4°C, y finalmente se resuspendió en PBS a 4°C. Los extractos fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

4.2. Preparación de los antígenos de membrana

El antígeno de membrana se obtuvo a partir de cultivos de los diferentes aislados en L-15 completo suplementado con 10% FBSi y 1% de solución PSA. Tras precipitar los ciliados por centrifugación a 700g durante 5 minutos, se realizaron 3 lavados con PBS (pH=7,4) y se resuspendieron en tampón HEPES suplementado (HEPES 30Mm, 20 mM KCl, 5mM MgSO₄, 0,5 mM EDTA, 1 mM de PMSF, , 1 mM dibucaína hidrocloreuro, pH 7,6). Al cabo de 15-20 minutos a temperatura ambiente, y tras comprobar al microscopio que se había producido la desciliación, los parásitos se centrifugaron 3 veces a 600g durante 5 minutos, para asegurar la completa eliminación de los parásitos enteros. El pellet se resuspendió entonces en PBS con 0,25 M sacarosa y se lisó ultrasónicamente en un sonicador Branson W-250 (Branson Ultrasonic Corporation, USA) sobre hielo, realizando 8 ciclos de sonicación de 10 pulsos (ciclos al 50% e intensidad de salida 4). El completo lisado de los parásitos se comprobó al microscopio óptico de contraste de fases (40X). Tras la sonicación, la disolución resultante se homogeneizó, y luego se centrifugó a 8000 g 5 minutos. El pellet se disolvió entonces en 3 ml de tampón HEPES suplementado y se aplicó a la parte superior de un gradiente de sacarosa con las concentraciones 0,5M, 1M y 0,5 M. Los tubos se centrifugaron a 6000 g y se recuperó con cuidado la parte correspondiente a la sacarosa 1M, que contiene la fracción membranosa. Esta fracción se volvió a centrifugar a 11000 g durante 20 minutos y, finalmente, el pellet se resuspendió en tampón HEPES con 0,5% de Triton X-114, con el fin de solubilizar las proteínas integrales de membrana (Bordier, 1981) durante 12 horas a 0 °C. Pasado este tiempo, la disolución se centrifugó a 8000xg durante 10 minutos, se resuspendió en PBS y se dializó frente a PBS con varios cambios de tampón a 4°C. Los antígenos de membrana de los diferentes aislados de *P. dicentrarchi* se almacenaron en alícuotas a -20 °C hasta su utilización.

4.3. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en las distintas preparaciones antigénicas fue determinada mediante el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo comercial BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories, Alemania). La curva de calibrado se realizó con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA; Sigma-Aldrich).

5. OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS

5.1. Obtención de sueros de ratón

5.1.1. Obtención de sueros de ratón anti-aislado

Para obtener los anticuerpos frente a los diferentes aislados, los ratones fueron inmunizados como ya se ha descrito previamente (Iglesias *et al.*, 1993). Cinco ratones fueron inyectados intramuscularmente los días 0 y 30 con 200 µl de una mezcla 1:1 (v/v) de adyuvante (Montanide IMS 1312 VG; Seppic, París, Francia) y una solución que contenía 10⁶ parásitos/ml en PBS y 0,1% formaldehído, para cada uno de los aislados. Al día 60, se obtuvieron muestras de sangre, por punción del plexo venoso retrobulbar, que se dejaron coagular durante 12 h a 4°C y se centrifugaron posteriormente a 10000 g durante 5 minutos. A continuación, se recogió el suero, se diluyó 1:1 (v/v) con glicerol y se almacenó a -80°C hasta su uso. Los sueros control sin anticuerpos se obtuvieron de ratones sin ningún tipo de tratamiento.

5.1.2. Obtención de sueros de ratón anti-membrana

Para obtener los anticuerpos anti-membrana de *P. dicentrarchi* contra los diferentes aislados, cinco ratones fueron inyectados intramuscularmente los días 0 y 30 con 200 µl de una mezcla 1:1 (v/v) de antígeno de membrana (2500 µg/ml) procedente de los correspondientes aislados y adyuvante (adyuvante completo de Freud en la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freud en la segunda inmunización). Al día 60, se obtuvieron muestras de sangre con el método ya descrito en el apartado anterior.

5.2. Obtención de sueros de rodaballo

5.2.1. Obtención de sueros de rodaballo anti-aislado

Para la obtención de los anticuerpos anti-aislado en rodaballo, se siguió el mismo protocolo utilizado para los ratones. Al día 60, se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena caudal, se dejaron coagular durante 6 h a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000 g 5 minutos. El suero se recogió entonces, se diluyó 1:1 (v/v) con glicerol y se almacenó a -80°C hasta su uso. Los sueros control sin anticuerpos se obtuvieron de rodaballos sin ningún tipo de tratamiento.

5.2.2. Obtención de sueros de rodaballo anti-membrana

Para obtener los anticuerpos anti-membrana de *P. dicentrarchi* contra los diferentes aislados, diez rodaballos fueron inyectados intraperitonealmente los días 0 y 30 con 200 µl de una mezcla 1:1 (v/v) de antígeno de membrana (2500 µg/ml) procedente de los correspondientes aislados y adyuvante (Montanide). Al día 60, se obtuvieron muestras de sangre con el método ya descrito en el apartado anterior.

5.3. Determinación de los niveles de anticuerpos en el suero

Los niveles de anticuerpos en suero se determinaron mediante un ensayo ELISA directo (en el caso de los sueros de ratón) y un ensayo ELISA doble-indirecto (en el caso de los sueros de rodaballo), utilizando los correspondientes antígenos de cada aislado (extracto crudo para los sueros anti-aislado y antígeno de membrana para los sueros anti-membrana) con su anti-suero homólogo.

6. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS AISLADOS

Para realizar las medidas del tamaño corporal, la ciliatura oral y el número de cinetias, y determinar la posición del poro de la vacuola contráctil de los distintos aislados de *P. dicentrarchi*, se utilizó la tinción de carbonato de plata amoniacal (Fernández-Galiano, 1994) modificada (también conocida como técnica española de carbonato de plata; Foissner, 1991). Los cilios somáticos y el cilio caudal se midieron a partir de parásitos fijados en formol al 10% tamponado (pH 7,2), con ayuda del microscopio de contraste de fases y el tamaño nuclear se determinó a partir de mediciones de suspensiones de parásitos teñidos con Hemacolor (Merck). En todas las mediciones realizadas se utilizaron un mínimo de 5 réplicas de cultivos diferentes, siempre en fase exponencial (día 2-3 de cultivo), de cada aislado de *P. dicentrarchi*. A continuación se exponen los caracteres morfológicos que se han medido y los tamaños de muestra utilizados:

- Longitud y anchura corporal (N= 250).
- Ratio longitud/anchura (N= 250).
- Longitud del campo bucal (N= 250).
- Ratio longitud del campo bucal/longitud corporal (N= 250).
- Longitud de la 1ª y de la 2ª membrana paraoral (PM1 y PM2) (N= 50).
- Longitud y anchura de las policinétidas orales 1, 2 y 3 (OPK1, OPK2 y OPK3) (N= 50).
- Distancia de OPK1 a OPK2 y de OPK2 a OPK3 (N= 50).
- Distancia desde el ápice del parásito al extremo anterior del OPK1 (N= 50).
- Número total de cinetias (N= 30).
- Longitud de los cilios somáticos (N= 100).
- Longitud del cilio caudal (N= 100).
- Tamaño nuclear (diámetros mayor y menor del micronúcleo y macronúcleo) (N= 100).
- Posición del poro de la vacuola contráctil (CVP) (N= 25).

6.1. Tinción carbonato de plata amoniacal modificada

Se tomaron aproximadamente 2×10^6 parásitos de un cultivo en fase exponencial en L-15 completo suplementado con 10% de FBSi y 1 % de solución PSA. Tras una centrifugación de 5 minutos a 650 g, se resuspendieron en formol al 10% tamponado, e inmediatamente se volvieron a centrifugar, resuspendiéndolos en 2 ml de tampón fosfato (PB) 20 mM.

Se preparó la mezcla de tinción, añadiendo estrictamente en este orden:

- 1 ml de solución acuosa 1,5% de Triton X-100.
- 17 gotas de solución de proteosa-peptona.
- 5 gotas de piridina pura.
- 1 ml de solución de carbonato de plata amoniacal.
- 15 ml de agua destilada.

Una vez preparada la mezcla, se añadieron los parásitos resuspendidos en PB 20 mM y se calentó el tubo al baño maría a 65 °C hasta que la solución adquirió un color coñac, tras lo cual se realizaron 3 lavados con PB 20 mM, dejando finalmente los parásitos resuspendidos en 0,5 ml de PB 20 mM. Las mediciones se realizaron con el microscopio óptico a 100X.

Preparación de la solución de carbonato de plata amoniacal

Se mezclan 150 ml de Na_2CO_3 (5% en agua destilada) y 50 ml de AgNO_3 (10% en agua destilada), formándose un precipitado blanco que se disuelve completamente añadiendo poco a poco NH_4OH y removiendo con una varilla de vidrio. Se añade luego Na_2CO_3 (5% en agua destilada) hasta completar los 1000 ml, se vierte en un frasco y se tapa con papel de aluminio, guardándose en un lugar oscuro. Esta solución necesita dos meses de maduración. Hay que filtrarla a través de papel de filtro antes de su uso.

Preparación de la solución de proteosa-peptona

Se mezclan 100 ml de proteosa-peptona (Difco) al 5% en agua destilada y se añaden 25 gotas de formol comercial (solución de formaldehído al 37%).

6.2. Tinción Hemacolor

Los parásitos se centrifugaron a 650g para eliminar el medio de cultivo, y a continuación se resuspendieron en metanol. Tras media hora de fijación, se eliminó el metanol y se añadió la solución 2 de Hemacolor. Inmediatamente se eliminó esta solución y se añadió la solución 3, eliminando ésta también rápidamente y realizando lavados con tampón fosfato (PB) 20 mM hasta eliminar el exceso de colorante. Finalmente, la suspensión celular fue resuspendida en PB 20 mM y observada al microscopio óptico a 100X.

6.3. Fijación de los parásitos con formol 10% tamponado

Los parásitos fueron centrifugados a 650g para eliminar el medio de cultivo y resuspendidos en 10% de formol tamponado. Pasada media hora, se eliminó el formol por centrifugación y se resuspendió la muestra en PB 20 mM, observándose al microscopio óptico de contraste de fases a 100X.

7. ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS AISLADOS

7.1. Extracción de ADN de los aislados del parásito

Los ciliados (5×10^6 células/ml) se recogieron por centrifugación a 650 g durante 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS. El ADN genómico se extrajo con el kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, y fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

7.2. Amplificación por PCR, clonación y secuenciación del ADN

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo siguiendo el método descrito en Leiro *et al.* (2000). Se amplificó un fragmento de 350 pares de bases (pb) del gen que codifica la subunidad 18S del ARN ribosómico (ARNr 18S) de *P. dicentrarchi*, utilizando una pareja de cebadores directo y reverso (PSSU1/PSSU2). Para la amplificación de la citocromo oxidasa 1 (Cox1) y la β -tubulina, el ADN se amplificó utilizando los cebadores directo/reverso RCox1/FCox1 y FPTubulin/RPTubulin, respectivamente, los cuales amplifican un fragmento de 398 pb en el caso de la Cox1, y un fragmento de 390 pb en el

caso de la β -tubulina. Los datos de los cebadores y fragmentos amplificados se indican en la Tabla 2.

Cebador	Región amplificada	Números de Acceso GenBank	Secuencia	Tamaño de los amplicones (bp)
PSSU1	386 del gen ARNr 18S	AY642280	GAGAAACGGCTACCACATCTA	349 bp
PSSU2	735 del gen ARNr 18S		CAGGTAAAGAGCCTACTCCA	
FCox1	25 del gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa	GQ342957	TCAGGTGCTGCACTAGC	398 bp
RCox1	423 del gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa		TGCTCTAAACTGAAAAATG	
FPTubin	169 del gen de la β -tubulina	GQ342956	CCTACCACGGAGACTCTGATT	390 bp
RPTubin	559 del gen de la β -tubulina		CCATAATTCTGTCGGGGTATT	

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores, regiones del gen amplificadas y tamaño (en pares de bases) de los amplicones utilizados en este estudio.

La mezcla de reacción de la PCR (100 μ l) se preparó con tampón de reacción (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, pH 9,0), 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs; Roche), 0,4 mM de cada cebador, 1 unidad de ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion®; Finnzymes) y 50 ng de ADN genómico de *P. dicentrarchi* como molde. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador automático (Mastercycler, Eppendorf, Alemania) bajo las siguientes condiciones: una fase inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C (SSUrRNA), 64 °C (β -tubulina) o 60 °C (Cox1), y 1 minuto a 72 °C; y una fase de extensión de 7 minutos a 72 °C. En todos los experimentos se incluyeron controles sin ADN, en los que en ninguno de los casos se obtuvieron productos de amplificación. Los productos de PCR (alícuotas de 25 μ l) fueron separados en un gel de agarosa al 2% en tampón Tris borato EDTA (TBE; 45 mM Tris, 45 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA, pH 8.0) incluyendo 0,5 mg/l de bromuro de etidio, utilizado para verificar la presencia de una sola banda del tamaño correcto, y se fotografiaron

en un aparato equipado con un transiluminador uV de intensidad variable (FluorChem® FC2) y un programa de autocaptura de imágenes (Alpha Innotech, USA).

Para concentrar y purificar los productos de PCR obtenidos se utilizó el sistema Microcon-PCR (Millipore, USA). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega, USA) empleando un kit comercial y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, tal y como se ha descrito previamente (Leiro et al., 2002). Así, tras el ligamiento del producto de PCR al vector, las células de *E. coli* (cepa DH_{5a}) fueron transformadas por electroporación en un electroporador Gene Pulser II (BioRad, USA), usando cubetas Gene Pulser® /*E. coli* Pulser™ con una separación de 0,1 cm a un voltaje de 1,8 kV, una capacitancia de 25 mF y una resistencia de 2000 Ω . Las células transformadas fueron seleccionadas en base a la sensibilidad al antibiótico ampicilina y a la presencia de actividad β -galactosidasa, mediante α -complementación. Para ello, las bacterias fueron cultivadas en placas con medio agar-LB que contenían 100 μ g/ml de ampicilina, junto con 50 μ l de una solución de 20 mg/ml del compuesto cromogénico 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactosido (X-Gal) y 20 μ l de un inductor de la síntesis de β -galactosidasa denominado isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración de 0,5 M, extendidos sobre la superficie del agar. Una vez crecidas las colonias, fueron seleccionadas las colonias blancas, que son aquellas que contienen el plásmido con el ADN insertado, y se pusieron a crecer en medio líquido LB con ampicilina (100 μ g/ml) toda la noche a 37 °C con agitación. El ADN plasmídico fue purificado usando el Plasmid Mini Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para confirmar la presencia y el tamaño del fragmento clonado, se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores T7 y SP6 que hibridan en una región que flanquea el lugar de inserción del producto de PCR en el vector pGEM-T Easy y los productos de PCR obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa para verificar la presencia de una banda del tamaño correcto. Finalmente, el gen clonado en el vector fue secuenciado en direcciones complementarias en un

secuenciador automático (Sistemas Genómicos S.L.; Valencia), con los cebadores correspondientes (T7 y SP6).

8. ANÁLISIS SEROLÓGICO DE LOS AISLADOS

8.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Los distintos antígenos de los aislados de *P. dicentrarchi* fueron separados por SDS-PAGE en geles lineales de poliacrilamida al 10% (Paramá *et al.*, 2004). Para el análisis polipeptídico se utilizaron geles reductores y no reductores. En el caso de los reductores, las muestras fueron reducidas y desnaturalizadas por incubación 5 minutos a 100 °C en tampón de la muestra (tampón Tris-HCl 62mM, pH 6,8, con 2% de sodio dodecil sulfato (SDS), 10% glicerol) conteniendo 0,1 M de ditioneitol (DTT). Las muestras para los geles no reductores se prepararon en este mismo tampón de la muestra, pero sin DTT y sin calentar las muestras. Los geles se corrieron a un amperaje constante de 0,05 A y un voltaje de 150 V durante 105-120 minutos.

A continuación, los geles fueron teñidos con azul Coomassie (Thermo Scientific GelCode Blue Safe Protein Stain; Pierce) para observar el patrón polipeptídico, y/o transferidos a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) para realizar el Western blot.

8.2. Transferencia y Western blot

Tras la electroforesis, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF Immobilon-P (0.45 µm; Millipore, USA) a un amperaje constante de 0,5A durante 30 minutos en una célula de transferencia Transblot SD (Biorad, USA) con tampón de transferencia (48 mM Tris, 29 mM glicina, 0.037% SDS y 20% metanol, pH 9,2). Una vez transferidas, las membranas se lavaron con tampón tris salino (TBS; 50mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7.4) y se tiñeron con Ponceau S para verificar la transferencia.

Para la realización de los Western blot con los sueros de ratón, los sitios de unión no específicos fueron bloqueados durante 1 hora con TBS con 0,2% Tween 20 (TBS-T) y un 5% de leche descremada en polvo, tras lo que se lavaron

con TBS-T y se incubaron 2 horas con suero de ratones inmunizados con el antígeno correspondiente de *P. dicentrarchi* (dilución 1/500). A continuación, las membranas se incubaron media hora con suero policlonal de conejo anti-Ig de ratón conjugado con una peroxidasa (Dakopatts, USA) diluido 1/800 en TBS-T 0,2%, y finalmente la actividad peroxidasa se reveló con 0.06% 3,3-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina que contenía 0.003% H₂O₂ y 0.03% NiCl₂ (DAB/NiCl₂, Sigma, USA). Pasados 5 minutos, la reacción se detuvo por lavado exhaustivo con TBS, y se escanearon las membranas teñidas. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente, y entre cada cambio de anticuerpo se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T 0,2%, excepto en el último, en el que se realizó un primer lavado con TBS con 0,05% de Tween 20 y los dos restantes con TBS.

En los Western blot con suero de rodaballo se utilizó este mismo protocolo, con la excepción de que tras el bloqueo y los lavados, las membranas se incubaron durante 3 h adicionalmente con una dilución 1:50 de suero de rodaballo (en TBS-T) y, tras 5 lavados con TBST, se incubaron 1 h con un anticuerpo monoclonal anti-Ig de rodaballo (UR3, (Estévez *et al.*, 1994)), diluido 1:1000 en TBS-T. A esta incubación le siguió otra de media hora con el anticuerpo conjugado y, tras el revelado, las membranas fueron finalmente escaneadas.

8.3. ELISA

Los niveles de anticuerpos en suero frente al extracto crudo o la fracción de membrana de los aislados de *P. dicentrarchi* se determinaron mediante un ELISA doble indirecto (en el caso de los sueros de rodaballo) (Estévez *et al.*, 1995), o un ELISA indirecto (en el caso de los sueros de ratón) (Iglesias *et al.*, 1993). Todo el proceso se llevó a cabo en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Las placas de ELISA de 96 pocillos (IWAKI) se tapizaron con 2 µg (en los ELISAS con sueros de ratón) o 0,5 µg (en los ELISAS con sueros de rodaballo) de antígeno por pocillo en tampón carbonato-bicarbonato (50 mM Na₂CO₃, 50

mM NaHCO₃, 0,05% p/v azida sódica, pH 9,6) y se incubaron toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, las placas fueron lavadas cinco veces con TBS y bloqueadas durante 90 minutos con TBST conteniendo un 5% de leche descremada. Una vez bloqueadas las placas, se incubaron 2 h a 37 °C con una dilución 1:50 de suero de rodaballo en TBS-T, o con una dilución 1:500 de suero de ratón en TBS-T. Sólo en el caso de los sueros de rodaballo, tras 5 lavados con TBS, las placas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-Ig de rodaballo (UR3; Estévez *et al.*, 1994) durante 1 h a 37°C, diluido 1:1000 en TBS-T 0,2%. Las placas se lavaron entonces con TBS 5 veces, y los anticuerpos de ratón ligados se detectaron por incubación 1 h a 37°C con un anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón conjugado con una peroxidasa (Dakopatts, USA) diluido 1:2000 en TBS-T. Tras diez lavados con TBS, se añadió a cada pocillo una solución de ortofenilendiamina (OPD; Sigma) al 0,04% en tampón fosfato-citrato (0,05 M Na₂HPO₄, 0,05M C₆H₈O₇, pH 5,0) y 0,001% H₂O₂. La reacción se detuvo a los 30 minutos con H₂SO₄ 3N, y se midió la densidad óptica (DO) a 492 nm con un lector de ELISA (Titertek Multiscan, Flow Laboratories).

Este mismo protocolo se utilizó para determinar la reactividad cruzada entre los antígenos de los diferentes aislados del parásito.

9. ANÁLISIS ECOFISIOLÓGICO DE LOS AISLADOS

9.1. Estudio del crecimiento *in vitro* de los aislados del parásito

Los ensayos de crecimiento *in vitro* de los distintos aislados se realizaron en placas de poliestireno de 24 pocillos (Nunc). Se inocularon ciliados procedentes de cultivos en fase exponencial temprana (1 x 10⁴ parásitos por pocillo), por triplicado, en un volumen final de 2 ml de L15 completo suplementado con 10% FBSi y 1% solución PSA. Las placas se incubaron a 21°C en una cámara húmeda, para prevenir la evaporación, y los cultivos fueron monitorizados diariamente durante el tiempo de duración de los ensayos con un microscopio invertido, y el número de ciliados en los pocillos triplicados se determinó con ayuda de una cámara de recuento Neubauer.

9.2. Ensayos de susceptibilidad a quimioterápicos

En el capítulo 5 se testó la actividad antiparasitica de la formalina (37%; Merck, Germany), el peróxido de hidrógeno (30%; Merck, Germany) y el resveratrol (RESV; Sigma) en agua de mar autoclavada y filtrada por 0,22 μ m, a las concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 ppm en siete aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1). Como fuente de alimento se utilizó *Vibrio anguillarum* inactivado por calor (10^6 células/ml). La supervivencia se determinó a las 24 y 72 horas de tratamiento, con el fin de determinar además la capacidad de recuperación de los parásitos tras el tratamiento.

En el capítulo 6 se estudiaron las diferencias en la susceptibilidad ante la formalina (37%) y el peróxido de hidrógeno (49,5%) de los 10 aislados de *P. dicentrarchi* obtenidos en la piscifactoría durante los muestreos realizados en los años 2007 y 2009, utilizando para la realización del ensayo agua de mar autoclavada de la propia planta de cultivo en la que se realizó el estudio. Las concentraciones testadas fueron 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 ppm. Puesto que el agua de mar no se filtró, la fuente de alimento consistió en la materia orgánica y las bacterias autóctonas de la planta de cultivo. La supervivencia de los ciliados se determinó a las 24 horas de tratamiento.

Los ensayos de resistencia se llevaron a cabo en placas de poliestireno de 24 pocillos (Iwaki), con 2 ml de medio por pocillo, por triplicado. Los ciliados, procedentes de cultivos en fase exponencial temprana, se lavaron dos veces en agua de mar, y se sembró en cada pocillo de la placa 1 ml de una suspensión de 2×10^5 parásitos/ml en agua de mar. Tras un período de estabilización de 12 horas, se añadió a cada pocillo 1 ml de la correspondiente concentración de cada producto químico. Los efectos de los compuestos en la morfología y motilidad de los ciliados se monitorizaron periódicamente con un microscopio invertido (Olympus IX50), y a las 24 o 72 horas post-inoculación se contabilizó el número de ciliados viables en los pocillos triplicados al microscopio invertido con ayuda de una cámara Neubauer con una magnificación de 400, fijándolos en 0,2% formalina cuando fue necesario, ya

que en las concentraciones elevadas de los quimioterápicos, la baja motilidad posibilitó el recuento sin necesidad de fijación, permitiendo así determinar la existencia o ausencia de movimiento ciliar.

Los resultados se expresan como % de mortalidad con respecto al grupo control sin tratamiento, calculada como $100 - (\text{n}^\circ \text{ de ciliados viables en el grupo experimental} \times 100) / \text{n}^\circ \text{ de ciliados viables en el grupo control}$). La concentración inhibitoria media (IC50) se calculó utilizando el método Probit (Finney, 1971), y la dosis letal mínima (MLD) fue determinada por la ausencia total de movimiento ciliar al microscopio óptico.

9.3. Ensayos de competencia entre aislados

Para testar la posible existencia de competencia entre los diferentes aislados, 3×10^4 parásitos de cada aislado, procedentes de cultivos en fase exponencial, fueron transferidos en grupos de dos a frascos de cultivo de 10 cm³ (Nunc) con un volumen de 10 ml de L15 completo suplementado con un 10% de FBSi y un 1% de PSA. Paralelamente, se cultivaron bajo las mismas condiciones frascos de cultivo con igual número de parásitos de los aislados individuales. Los frascos de cultivo se incubaron a 21°C y fueron monitorizados diariamente con un microscopio invertido. Diez días más tarde, cuando los cultivos mostraban síntomas evidentes de falta de alimento, se recogieron los ciliados por centrifugación y se extrajeron los lisados de cada cultivo, mediante el método ya descrito anteriormente. Con el fin de determinar el serotipo presente en cada cultivo, los lisados se separaron por electroforesis, se transfirieron a membranas de PVDF y se llevó a cabo un Western blot frente a suero de ratón anti-*P. dicentrarchi*.

10. ENSAYOS DE PROTECCIÓN CRUZADA ENTRE AISLADOS

Para los ensayos de protección cruzada se emplearon grupos de 50 peces que fueron inyectados intraperitonealmente los días 0 y 30 (temperatura del agua 15°C) con 100 µl de una mezcla 1:1 (v/v) de adyuvante (Montanide IMS 1312 VG; Seppic, París, Francia) y una solución que contenía 10⁶ parásitos/ml

en PBS del aislado correspondiente y 0,1% formaldehído. Pasados 30 días tras la segunda vacunación, se llevó a cabo un reto (temperatura del agua 15°C), siguiendo la metodología previamente descrita (Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008). El inóculo para el reto se preparó haciendo crecer los parásitos en medio L15 completo suplementado con 10% de FBSi y 1% de solución PSA. Los peces se inyectaron intraperitonealmente con 0,2 ml de inóculo ($2,5 \times 10^6$ parásitos/ml) en PBS, y la mortalidad fue monitorizada diariamente durante 38 días y expresada como mortalidad acumulada. La causa de la muerte se verificó por reaislado del parásito de los órganos internos del pez.

Antes del reto, 5 peces de cada grupo fueron desangrados por punción de la vena caudal para obtener muestras de suero, y los niveles de anticuerpos frente al aislado correspondiente se determinaron mediante ELISA doble indirecto, utilizando los correspondientes antígenos con sus anticuerpos homólogos.

11. ANÁLISIS DE DATOS

11.1. Análisis de los resultados del análisis morfológico

Se ha utilizado un análisis canónico discriminante (CDA) para determinar la combinación de variables que mejor pudiera ayudar en la discriminación y separación de los siete aislados de *P. dicentrarchi* obtenidos. Dado un conjunto de variables de clasificación, el CDA obtiene unas funciones canónicas, que son combinaciones lineales de las variables, que resumen la variación entre clases. El análisis factorial discriminante se realizó con el programa libre R (R Development Core Team, 2011), *candisc* y *MASS* (Venables y Ripley, 2002).

Se utilizó un análisis jerárquico de clústeres con valores estandarizados (Crossa y Franco, 2004) para determinar los agrupamientos de aislados tras el análisis de los cambios *in vitro* en tamaño y complejidad con el programa SPSS.

11.2. Análisis de los resultados de los análisis genéticos

El alineamiento y consenso de las secuencias de estudio se llevó a cabo con el programa Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) y se editaron con el programa Jalview Multiple Alignment Editor V1.8. Los lugares que contenían huecos fueron excluidos. Para cuantificar las divergencias en las secuencias de los aislados se calcularon las distancias genéticas, mediante el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980), introducido en el programa MEGA version 4.1 (Tamura *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008). Los árboles filogenéticos fueron contruídos con el programa MEGA, por el método del vecino más próximo (*neighbour-joining*: NJ) aplicado al modelo de corrección de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) mediante *bootstrapping* con 1000 replicados (Felsenstein, 1985). El programa Arlequin v 3.11 (S. Schneider, D. Roessli, and L. Excoffier, Genetics and Biometry Laboratory, University 245 of Geneva, Geneva, Switzerland) (<http://www.cmpg.unibe.ch/>) se utilizó para la búsqueda de haplotipos compartidos por los distintos aislados de *P. dicentrarchi*; el análisis del nivel de intrapoblación para la estimación de la frecuencia de los haplotipos se realizó según los métodos descritos por Dempster y Rubin (1983), Excoffier y Slatkin (1995) y Excoffier *et al.* (2003). Las proyecciones del plegamiento del ARN y las estructuras secundarias se generaron con el programa DAMBE (Xia, 2001; Xia y Xie 2001), que usa algoritmos de la *Vienna RNA folding library* (Hofacker *et al.* 1994, 1998).

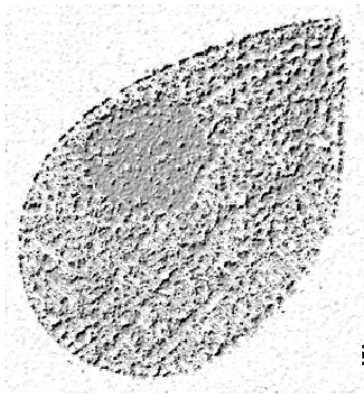
11.3. Análisis de los resultados de los análisis de protección cruzada

Los resultados de los ensayos de protección cruzada se analizaron utilizando el test estadístico Kaplan-Meier, con el programa SPSS.

11.4. Análisis de los resultados de los análisis ecofisiológico

Para los experimentos de susceptibilidad a fármacos se determinó la dosis letal 50 (DL50) y se calculó el 95% del nivel confianza mediante un análisis probit (Finney, 1971). Las actividades parasitocidas fueron determinadas mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias significativas se determinaron mediante un test de rango múltiple (Tukey-HSD).

Bajo el supuesto de una relación no lineal, el efecto de un producto sobre la mortalidad se evaluó a través de un modelo aditivo generalizado (GAM; Hastie y Tibshirani, 1990; Wood, 2006). Los resultados se afinaron mediante la utilización de modelos de regresión de placas finas seleccionando de forma automática los grados de libertad óptimos (FED) mediante el uso de la validación cruzada (Wood, 2003). Los modelos se representaron con la función GAM de la librería mgcv (Wood, 2006) disponible en la versión libre del software R versión 2.12.1 (R Development Core Team, 2011).



Capítulo 1

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS AISLADOS DE *P. dicentrarchi*

Las investigaciones morfológicas y ecofisiológicas realizadas con clones de cultivos han revelado un inesperado alto grado de variación intraespecífica en ciliados acuáticos (Weisse y Lettner, 2002; Lowe *et al.* 2005; Weisse y Rammer, 2006; Boenigk *et al.*, 2007).

Los ciliados tienen morfologías complejas que pueden ser claramente reveladas por varios métodos, especialmente por técnicas de impregnación en plata y microscopía, y en estas técnicas se ha basado a lo largo de los años la identificación y sistemática de ciliados. Existen, sin embargo, algunas dificultades asociadas con el uso de estas técnicas en ciliados, como ilustran algunos ejemplos de confusión taxonómica citados en la literatura (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004b; Paramá *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2009a).

En este estudio se ha examinado la variación morfométrica intraespecífica entre siete aislados del parásito escuticociliado *P. dicentrarchi* utilizando un análisis canónico discriminante (CDA) para seleccionar el subconjunto de caracteres que mejor identifican a cada aislado, y conseguir agruparlos en un diagrama de dispersión.

Dado un conjunto de variables de clasificación, el CDA obtiene unas funciones canónicas, que son combinaciones lineales de las variables y resumen la variación entre clases. Este análisis se ha utilizado en este estudio con el fin de determinar la combinación de variables que mejor pudiera ayudar en la discriminación y separación de los siete aislados de *P. dicentrarchi* obtenidos.

RESULTADOS

Para este estudio se han utilizado siete aislados procedentes de diferentes localizaciones geográficas en Galicia y Portugal (Fig. 12).

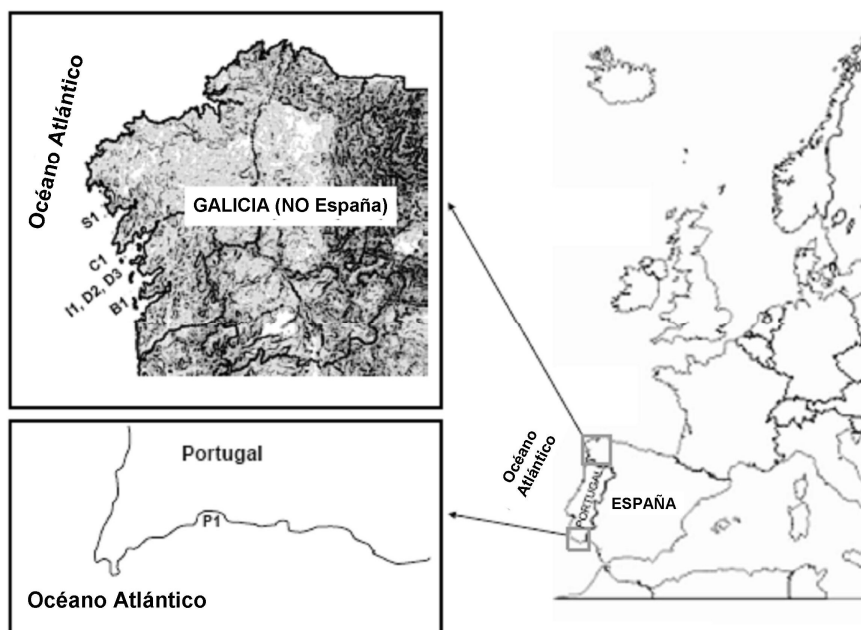


Figura 12. Mapa que muestra las áreas geográficas del noroeste de España y suroeste de Portugal donde fueron obtenidos los diferentes aislados de *Philasterides dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1) utilizados en este estudio. Los aislados D2 y D3 se obtuvieron en la misma piscifactoría.

Para cada aislado se midieron una serie de caracteres morfológicos con importancia taxonómica: longitud corporal (L), ancho corporal (A), ratio L/A, longitud del campo bucal (LBF), ratio LBF/L, longitud de la membrana paraoral 1 y 2 (PM1 y PM2), longitud y ancho de las tres policinétidas orales (OPK1, OPK2 y OPK3), distancia entre OPK1-OPK2 y entre OPK2-OPK3, distancia desde el ápice al extremo anterior de la OPK1, diámetros mayor y menor del macronúcleo y micronúcleo, número total de cinetias, longitud de los cilios somáticos y del cilio caudal y, finalmente, la posición del poro de la vacuola contráctil posterior (CVP).

Tras la impregnación con carbonato de plata amoniacal y el examen al microscopio óptico, todos los aislados mostraron las características morfológicas típicas descritas para la especie *Philasterides dicentrarchi* (Dragesco *et al.*, 1995; Iglesias *et al.*, 2001) (Tabla 3; Fig. 13).

ESPECIE	CARÁCTER	DESCRIPCIÓN
<i>Philasterides dicentrarchi</i>	Ciliatura somática	<p>-Constituida por 13-14 cinetias bipolares (raramente 15), formadas a su vez por 24 a 36 cinétidas, que son bicinétidas en las 2/3 partes anteriores del cuerpo.</p> <p>-Una línea meridiano-directora no ciliada que se encuentra localizada entre la primera y última cinetia, comenzando justo posteriormente a la escutica y que se fusiona con la primera cinetia en el extremo posterior.</p> <p>-En el extremo antiapical presenta una fibra circular polar que conecta todas las cinetias excepto la última, circundando el complejo cuerpo-basal polar.</p> <p>-Otra fibra de la última cinetia continúa, pasando a través del complejo cuerpo-basal polar, hasta su contacto con la fibra circular polar a nivel de las cinetias 7 u 8.</p>
	Cavidad bucal	-La membrana paraoral (PM) está siempre dividida en dos partes: PM1 y PM2, separadas por un espacio estrecho, y tres policinétidas orales: OPK1, OPK2 y OPK3.
	Poro de la vacuola posterior	-Se abre en el extremo posterior de la segunda cinetia.
	Cilio caudal	-Siempre presenta un cilio caudal en el polo antiapical más largo que los cilios somáticos.

Tabla 3. Resumen de los principales caracteres morfológicos utilizados para la identificación de la especie *P. dicentrarchi*.

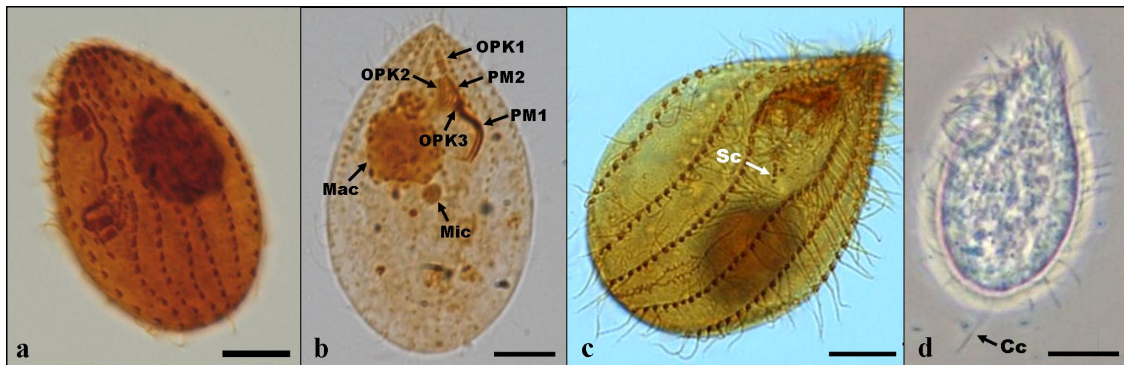
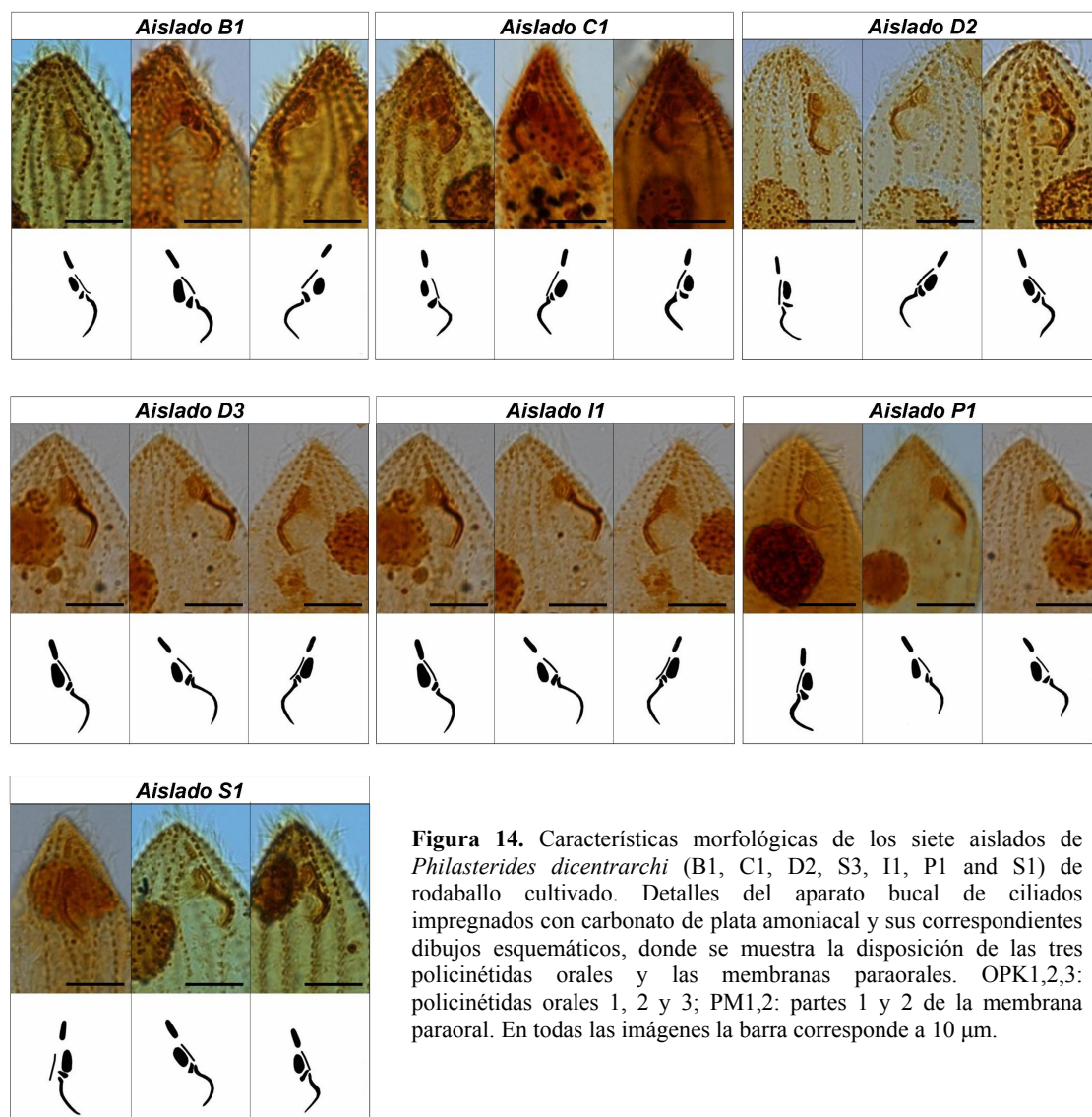


Figura 13. Especímenes de *Philasterides dicentrarchi* impregnados con carbonato de plata amoniacal con piridina (1a, 1b, 1c) y fijados con formalina (1d), mostrando una fase de la estomatogénesis (1a), Los aparatos bucal y nuclear (1b) y el escuticovestigio (1c). Abreviaturas: policinétidas orales (OPK), membranas paraorales (PM), macronúcleo (Mac), micronúcleo (Mic), escutica (Sc), cilio caudal (Cc). Las barras representan 10 μm .

Los ciliados son alargados y fusiformes, con un extremo anterior puntiagudo y un extremo posterior redondeado, una vacuola contráctil y un cilio caudal (Fig. 13a,d). El aparato bucal está formado por una membrana paraoral (PM) dividida en dos partes bien diferenciadas (PM1 y PM2) separadas en todos los individuos examinados por un espacio estrecho, y 3 policinétidas orales (OPK1, OPK2 y OPK3) (Figs. 13a,c y Fig. 14). La PM1 se extiende hacia atrás una corta distancia desde poco antes del extremo anterior de la OPK1 hasta cerca de la mitad de la OPK3, y la PM2 se extiende desde el final posterior de la OPK3 hasta el fin de la cavidad bucal (Fig. 13a,c y Fig. 14). La ciliatura somática consiste en 13-15 cinetias, y la última de ellas termina a medio camino a lo largo de la membrana paraoral (Fig. 13b,d y Fig. 15). Entre la primera y la última cinetia se localiza un meridiano director no ciliado que se une con la primera cinetia en el polo posterior, y la vacuola contráctil se localiza en el extremo de la segunda cinetia somática (Fig. 13b,d y Fig. 15).



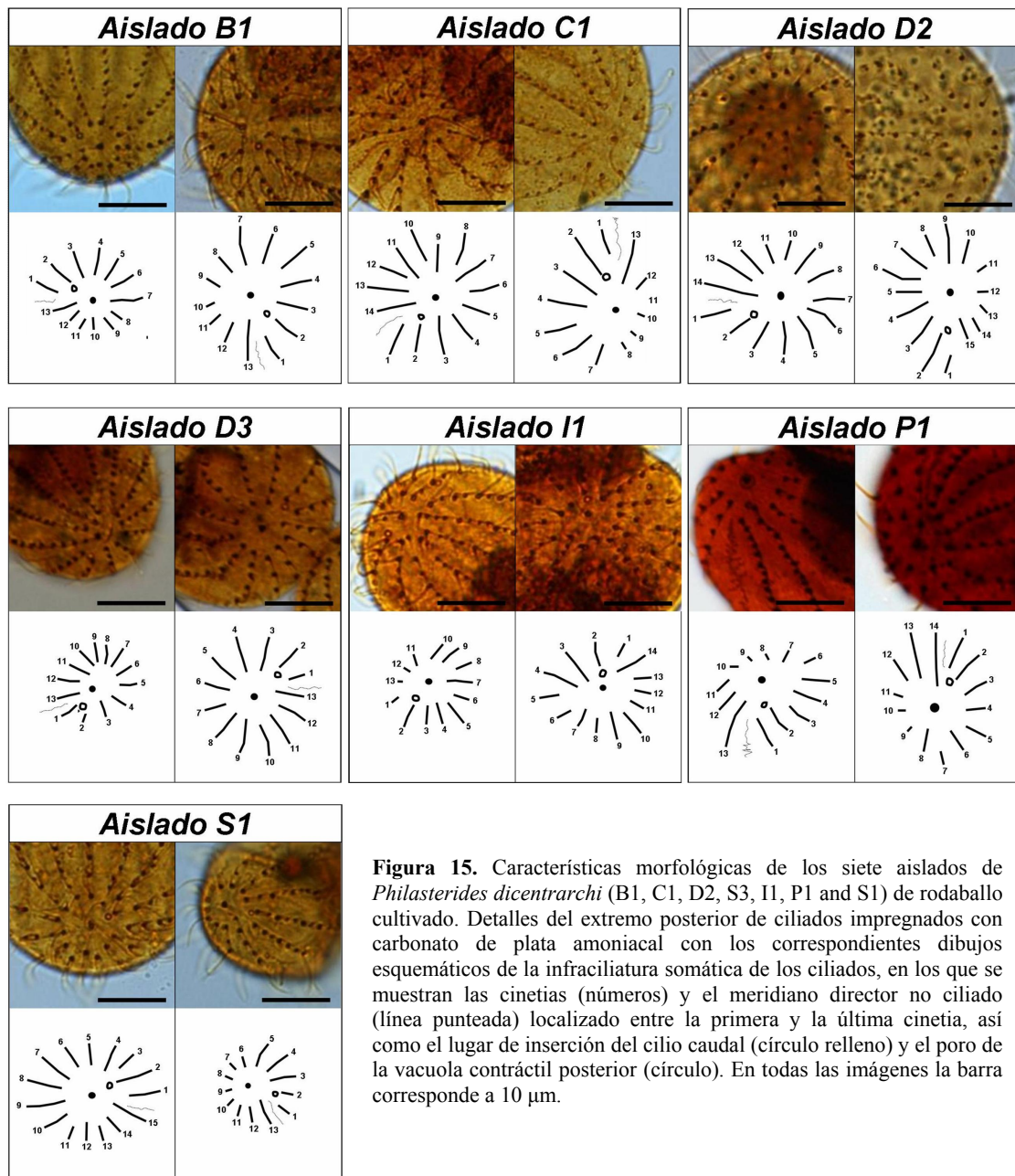


Figura 15. Características morfológicas de los siete aislados de *Philasterides dicentrarchi* (B1, C1, D2, S3, I1, P1 and S1) de rodaballo cultivado. Detalles del extremo posterior de ciliados impregnados con carbonato de plata amoniacoal con los correspondientes dibujos esquemáticos de la infraciliatura somática de los ciliados, en los que se muestran las cinetias (números) y el meridiano director no ciliado (línea punteada) localizado entre la primera y la última cinetia, así como el lugar de inserción del cilio caudal (círculo relleno) y el poro de la vacuola contráctil posterior (círculo). En todas las imágenes la barra corresponde a 10 µm.

Para cada uno de los siete aislados se midieron 23 caracteres morfológicos (Tabla 4) con valor taxonómico a la hora de identificar especies de escuticociliados. La caracterización morfométrica de los aislados, realizada a partir de estas mediciones, se muestra en la Tabla 4.

En la figura 16 se muestran los diagramas de caja para todos los caracteres medidos en los siete aislados del ciliado.

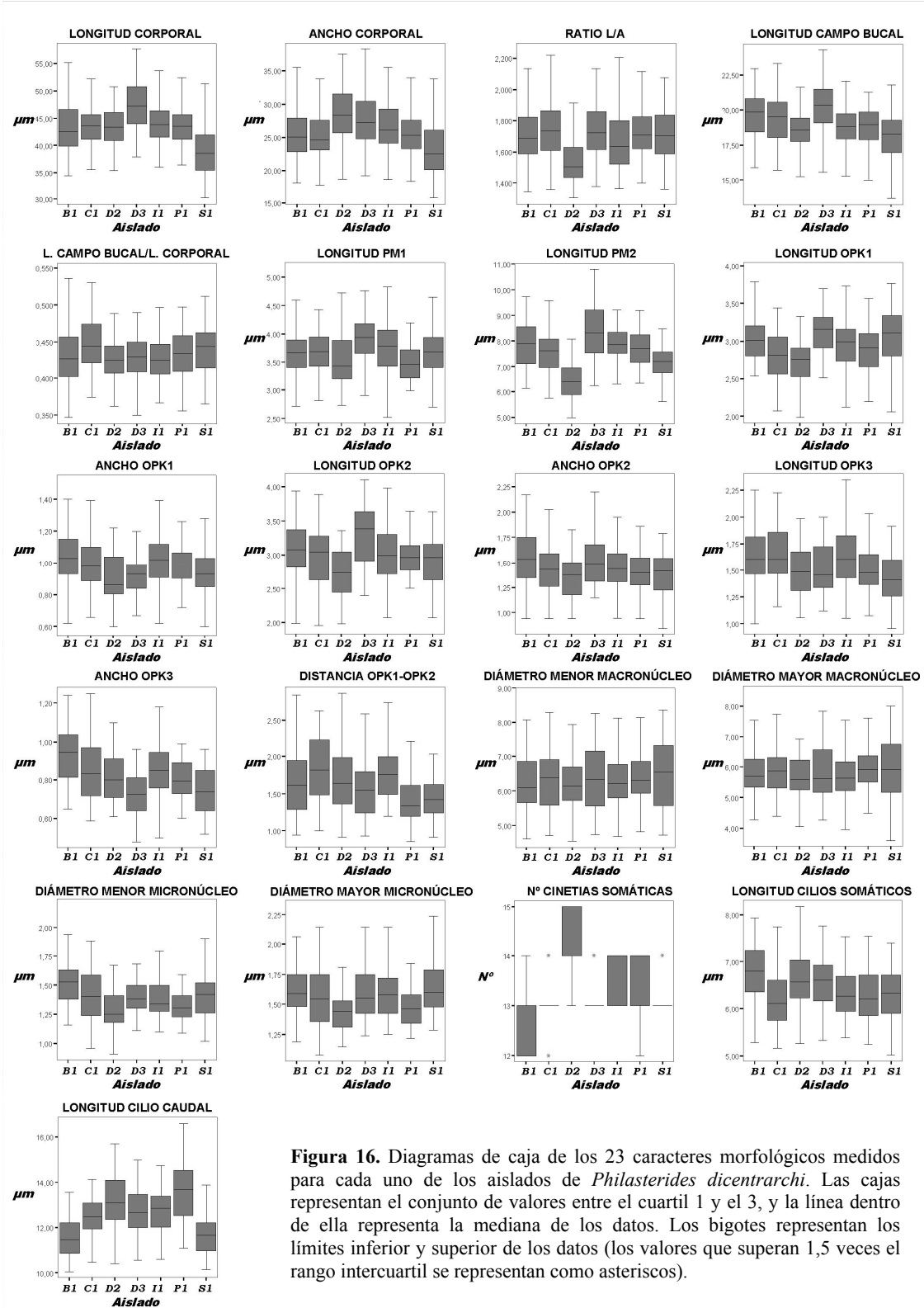


Figura 16. Diagramas de caja de los 23 caracteres morfológicos medidos para cada uno de los aislados de *Philasterides dicentrarchi*. Las cajas representan el conjunto de valores entre el cuartil 1 y el 3, y la línea dentro de ella representa la mediana de los datos. Los bigotes representan los límites inferior y superior de los datos (los valores que superan 1,5 veces el rango intercuartil se representan como asteriscos).

CARACTER	AISLADO						
	B1	C1	D2	D3	I1	P1	S1
Dimensiones corporales							
Longitud	43,377 ± 4,609 (34,45-55,23)	43,617 ± 3,568 (33,64-52,96)	43,385 ± 3,402 (35,36-50,85)	47,431 ± 4,270 (37,94-57,66)	44,079 ± 3,506 (35,98-53,92)	43,467 ± 3,274 (36,38-52,76)	39,163 ± 4,615 (30,24-51,34)
Ancho	25,725 ± 3,905 (18,16-36,26)	25,276 ± 3,401 (17,79-35,47)	28,512 ± 3,878 (20,20-27,57)	27,700 ± 3,908 (19,23-38,28)	26,676 ± 3,571 (18,62-35,56)	25,537 ± 3,159 (18,37-34,26)	23,194 ± 3,982 (15,77-33,80)
Longitud/Ancho	1,703 ± 0,161 (1,34-2,14)	1,744 ± 0,184 (1,35-2,26)	1,537 ± 0,143 (1,30-1,94)	1,730 ± 0,169 (1,38-2,13)	1,671 ± 0,184 (1,36-2,21)	1,718 ± 0,144 (1,40-2,19)	1,709 ± 0,163 (1,36-2,08)
Tamaño nuclear							
Macronúcleo (diámetro mayor)	6,227 ± 0,879 (4,61-8,08)	6,293 ± 0,867 (4,71-8,29)	6,195 ± 0,711 (4,55-7,95)	6,411 ± 0,993 (4,74-8,28)	6,332 ± 0,789 (4,69-8,33)	6,399 ± 0,822 (4,82-8,85)	6,501 ± 1,014 (4,73-8,37)
Macronúcleo (diámetro menor)	5,822 ± 0,769 (4,28-7,85)	5,863 ± 0,754 (4,39-7,75)	5,706 ± 0,744 (4,04-7,85)	5,846 ± 0,919 (4,27-7,83)	5,743 ± 0,782 (3,95-7,98)	5,974 ± 0,820 (4,49-8,45)	5,930 ± 0,991 (3,60-8,00)
Micronúcleo (diámetro mayor)	1,612 ± 0,203 (1,19-2,07)	1,565 ± 0,290 (1,08-2,15)	1,435 ± 0,171 (1,15-2,00)	1,608 ± 0,231 (1,24-2,15)	1,605 ± 0,216 (1,25-2,24)	1,480 ± 0,159 (1,22-1,84)	1,645 ± 0,236 (1,29-2,32)
Micronúcleo (diámetro menor)	1,518 ± 0,195 (1,16-2,03)	1,389 ± 0,236 (0,96-1,88)	1,284 ± 0,160 (0,91-1,67)	1,415 ± 0,179 (0,98-1,98)	1,401 ± 0,186 (1,10-1,95)	1,328 ± 0,139 (1,09-1,76)	1,438 ± 0,248 (1,02-2,19)
Ciliatura somática							
Número de cinetias somáticas	12,700 ± 0,758 (12-14)	13,111 ± 0,506 (12-14)	14,179 ± 0,612 (13-15)	13,189 ± 0,397 (13-14)	13,441 ± 0,504 (13-14)	13,186 ± 0,627 (12-14)	13,179 ± 0,390 (13-14)
Longitud de los cilios somáticos	6,783 ± 0,646 (5,28-7,95)	6,179 ± 0,552 (5,17-7,76)	6,598 ± 0,614 (5,26-8,19)	6,557 ± 0,581 (5,33-7,77)	6,337 ± 0,491 (5,38-7,54)	6,274 ± 0,567 (5,25-7,55)	6,299 ± 0,604 (5,02-7,39)
Longitud del cilio caudal	11,533 ± 0,899 (10,05-13,56)	12,463 ± 0,812 (10,47-14,12)	13,146 ± 1,183 (10,41-15,71)	12,732 ± 0,998 (10,55-15,00)	12,737 ± 0,936 (10,5-14,75)	13,627 ± 1,318 (11,08-16,66)	11,700 ± 0,824 (10,14-13,87)
Ciliatura oral							
Longitud PM1	3,678 ± 0,463 (2,66-4,84)	3,681 ± 0,380 (2,81-4,43)	3,553 ± 0,467 (2,73-4,73)	3,952 ± 0,453 (2,90-5,15)	3,734 ± 0,489 (2,52-4,83)	3,492 ± 0,330 (2,99-4,19)	3,690 ± 0,408 (2,70-4,65)
Longitud PM2	7,891 ± 0,936 (6,15-9,75)	7,545 ± 0,908 (5,77-9,60)	6,445 ± 0,746 (5,00-8,09)	8,420 ± 1,120 (6,24-10,80)	7,873 ± 0,660 (6,30-9,21)	7,737 ± 0,711 (6,36-9,20)	7,153 ± 0,732 (5,24-8,49)
Longitud OPK1	3,043 ± 0,323 (2,54-3,82)	2,801 ± 0,345 (2,08-3,44)	2,761 ± 0,296 (2,14-3,51)	3,114 ± 0,361 (2,18-3,96)	2,963 ± 0,422 (2,04-3,95)	2,897 ± 0,294 (2,20-3,57)	3,050 ± 0,390 (2,06-3,77)
Ancho OPK1	1,041 ± 0,181 (0,82-1,51)	0,997 ± 0,170 (0,66-1,39)	0,908 ± 0,149 (0,60-1,22)	0,926 ± 0,122 (0,67-1,23)	1,001 ± 0,177 (0,58-1,50)	0,985 ± 0,123 (0,72-1,23)	0,940 ± 0,155 (0,60-1,28)
Longitud OPK2	3,052 ± 0,486 (1,92-3,95)	2,968 ± 0,466 (1,96-3,90)	2,719 ± 0,394 (1,98-3,36)	3,305 ± 0,423 (2,40-4,05)	3,024 ± 0,423 (2,07-3,99)	2,990 ± 0,268 (2,51-3,65)	2,910 ± 0,381 (2,07-3,64)
Ancho OPK2	1,548 ± 0,262 (0,94-2,17)	1,436 ± 0,242 (0,94-2,03)	1,353 ± 0,209 (0,94-1,83)	1,530 ± 0,261 (1,15-2,32)	1,444 ± 0,235 (0,95-2,03)	1,408 ± 0,195 (0,94-1,86)	1,393 ± 0,219 (0,85-1,79)
Longitud OPK3	1,633 ± 0,254 (1,00-2,25)	1,640 ± 0,245 (1,16-2,23)	1,498 ± 0,246 (1,06-1,99)	1,519 ± 0,245 (1,12-2,00)	1,627 ± 0,307 (1,05-2,35)	1,515 ± 0,212 (1,08-2,07)	1,413 ± 0,229 (0,96-1,92)
Ancho OPK3	0,927 ± 0,150 (0,65-1,24)	0,853 ± 0,173 (0,59-1,25)	0,815 ± 0,122 (0,61-1,10)	0,724 ± 0,109 (0,48-0,96)	0,847 ± 0,166 (0,50-1,24)	0,807 ± 0,102 (0,60-0,99)	0,741 ± 0,113 (0,52-0,96)
Distancia OPK1-OPK2	1,686 ± 0,488 (0,94-2,85)	1,847 ± 0,452 (1,00-2,63)	1,695 ± 0,453 (0,91-2,87)	1,561 ± 0,413 (0,93-2,59)	1,773 ± 0,372 (1,20-2,74)	1,391 ± 0,317 (0,86-2,22)	1,432 ± 0,286 (0,91-2,03)
Distancia OPK2-OPK3	0,915 ± 0,273 (0,47-1,63)	0,834 ± 0,205 (0,54-1,61)	0,720 ± 0,143 (0,46-1,19)	0,765 ± 0,160 (0,51-1,18)	0,815 ± 0,202 (0,48-1,46)	0,736 ± 0,107 (0,54-1,08)	0,755 ± 0,179 (0,43-1,19)
Dist. apex-estremo anterior OPK1	4,082 ± 0,588 (3,13-5,57)	3,987 ± 0,779 (2,30-5,64)	4,296 ± 0,711 (2,82-6,06)	4,112 ± 0,764 (2,48-5,54)	3,981 ± 0,545 (2,77-5,01)	3,791 ± 0,733 (2,38-5,30)	3,628 ± 0,591 (2,54-4,85)
Longitud del campo bucal (LCB)	19,678 ± 1,608 (15,89-22,99)	19,406 ± 1,675 (15,75-23,35)	18,517 ± 1,384 (14,35-21,64)	20,256 ± 1,757 (15,58-24,32)	18,851 ± 1,346 (15,31-22,09)	18,776 ± 1,419 (15,00-21,29)	18,068 ± 1,770 (13,65-21,80)
LCB/Longitud corporal	0,438 ± 0,041 (0,35-0,55)	0,447 ± 0,037 (0,37-0,53)	0,425 ± 0,027 (0,35-0,51)	0,436 ± 0,028 (0,35-0,49)	0,428 ± 0,027 (0,37-0,50)	0,435 ± 0,030 (0,36-0,50)	0,440 ± 0,033 (0,36-0,51)
Posición del CVP	Límite posterior de 2ª cinetia	Límite posterior de 2ª cinetia	Límite posterior de 2ª cinetia	Límite posterior de 2ª cinetia	Límite posterior de 2ª cinetia	Límite posterior de 2ª cinetia	Límite posterior de 2ª cinetia

Tabla 4. Características morfométricas de los trofozoitos de distintos aislados de *Phylasterides dicentrarchi* obtenidos de rodaballos infectados naturalmente. Las medidas están en mm. Los datos se refieren a media±desviación estándar y rangos (entre paréntesis) de 250 individuos procedentes de 5 replicados. Abreviaturas: PM1,2 = membrana paraoral parte 1 y 2; OPK1,2,3 = policinétidas orales 1, 2 y 3; LCB = longitud del campo bucal; CVP = poro de la vacuola contráctil.

Dado un conjunto de variables de clasificación, el CDA obtiene unas funciones canónicas, combinaciones lineales de las variables, que resumen la variación entre clases. Este análisis se ha utilizado en este estudio para determinar la combinación de variables que mejor pudiera ayudar en la discriminación y separación de los siete aislados de *P. dicentrarchi* obtenidos. Para realizar el CDA, las medidas deben corresponder a un mismo individuo. Debido a la imposibilidad de medir los 23 caracteres simultáneamente en un mismo individuo, sólo se pudieron incluir 16 de los caracteres morfológicos en el CDA. Los caracteres incluidos son aquellos que corresponden a las dimensiones corporales de los ciliados, el aparato bucal y todas las medidas derivadas de ellos.

A partir del CDA se generaron seis funciones canónicas. Los resultados del CDA indican que la primera función posee la mayor capacidad discriminante, explicando el 37,2% de la variación total, seguida por la segunda función, con una capacidad discriminatoria del 33%, y la mayor correlación canónica se obtuvo también para estas dos funciones (Tabla 5). La varianza explicada por las dos funciones canónicas seleccionadas supone el 70,7% de la varianza total (Tabla 5).

Función	Autovalores	% de varianza explicada	Varianza acumulada (%)	Correlación canónica
1	0.724	37.2	37.2	0.648
2	0.653	33.5	70.7	0.628
3	0.295	15.1	85.9	0.477
4	0.134	6.9	92.7	0.344
5	0.113	5.8	98.6	0.319
6	0.028	1.4	100.0	0.165

Tabla 5. Funciones discriminantes canónicas utilizadas en el análisis.

Los coeficientes estandarizados y de estructura de las variables incluidas en el CDA para las dos primeras funciones discriminantes se enumeran en la Tabla 6. Estos coeficientes representan las contribuciones de las 16 variables a cada función. El examen de estos factores revela las variables que más contribuyen a las puntuaciones alcanzadas por cada función. El índice de potencia permite la interpretación simultánea de estas dos funciones (ver columna final de la Tabla 6). Para una variable dada, este índice combina la contribución de esa variable para cada una de las funciones canónicas (a través de los coeficientes de correlación o estructura) con importantes funciones en la solución final (a través del porcentaje relativo). A pesar de que los valores de este índice no tienen poder discriminante, pueden ser entendidos como una medida relativa de la importancia de cada variable en las dos funciones discriminantes obtenidas: a mayor índice de potencia, mayor es la contribución de la variable en la discriminación entre grupos. Teniendo en cuenta este índice, las 8 variables que más contribuyen en la discriminación entre los distintos aislados (índice de potencia > 0,05) son, en orden de importancia: el ancho de la OPK3, la longitud de la PM2, la longitud del campo bucal, el ancho corporal, el ratio L/A, la longitud corporal, el ancho de la OPK1 y la distancia entre OPK2-OPK3 (Tabla 6).

Variables	Coeficientes estandarizados		Coeficientes de estructura		INDICE DE POTENCIA
	FUNCIÓN 1	FUNCIÓN 2	FUNCIÓN 1	FUNCIÓN 2	
Ancho OPK3	0.097	0.526	0.725*	0.504*	0.309701912*
Longitud PM2	0.721	0.068	0.725*	-0.126	0.210875011*
Longitud campo bucal	0.610	-0.630	0.422	-0.158	0.150716523*
Ancho	-0.909	-0.595	0.249	-0.144	0.113135349*
Longitud/Ancho	-	-	0.387	0.191	0.109306358*
Longitud	0.370	0.422	0.331	-0.018	0.108666897*
Ancho OPK1	0.064	0.607	0.317	0.381	0.086364958*
Distancia OPK2-3	0.053	0.255	0.176	0.258	0.051947673*
Longitud OPK1	-0.047	-0.232	0.279	-0.204	0.047655911
Distancia ápice-extremo anterior OPK1	-0.359	0.434	-0.100	0.081	0.046982462
Longitud PM1	-0.128	-0.261	0.205	-0.210	0.042197503
Longitud OPK2	-	-	0.317	-0.023	0.038917427
Distancia OPK1-2	-0.110	0.455	-0.050	0.289	0.037635804
Ancho OPK2	-	-	0.249	0.041	0.025909054
Longitud OPK3	-	-	0.058	0.136	0.012850910
Longitud campo bucal/Longitud cuerpo	-	-	0.024	-0.165	0.010698761

Tabla 6. Medidas interpretativas de las funciones discriminantes. Los valores representan los coeficientes estandarizados y los coeficientes de estructura de las 16 variables para las dos funciones discriminantes estimadas. Los asteriscos incluidos con los coeficientes de estructura indican los valores que ayudan a explicar las diferencias entre los aislados. Para la interpretación simultánea de las funciones se utilizó el índice de potencia, y en la tabla se indican los valores superiores a 0.05, que representan una mayor contribución de la variable a la discriminación.

El agrupamiento generado por las dos funciones discriminantes puede observarse en la Figura 17, en la que se muestran las elipses de confianza (95%) y los centroides de cada grupo. La precisión del porcentaje de predicción para cada aislado fue del 59% para el aislado B1, 53% para el aislado C1, 65% para el aislado D2, 68% para el aislado D3, 48% para el aislado I1, 47% para el aislado P1 y 53% para el aislado S1.

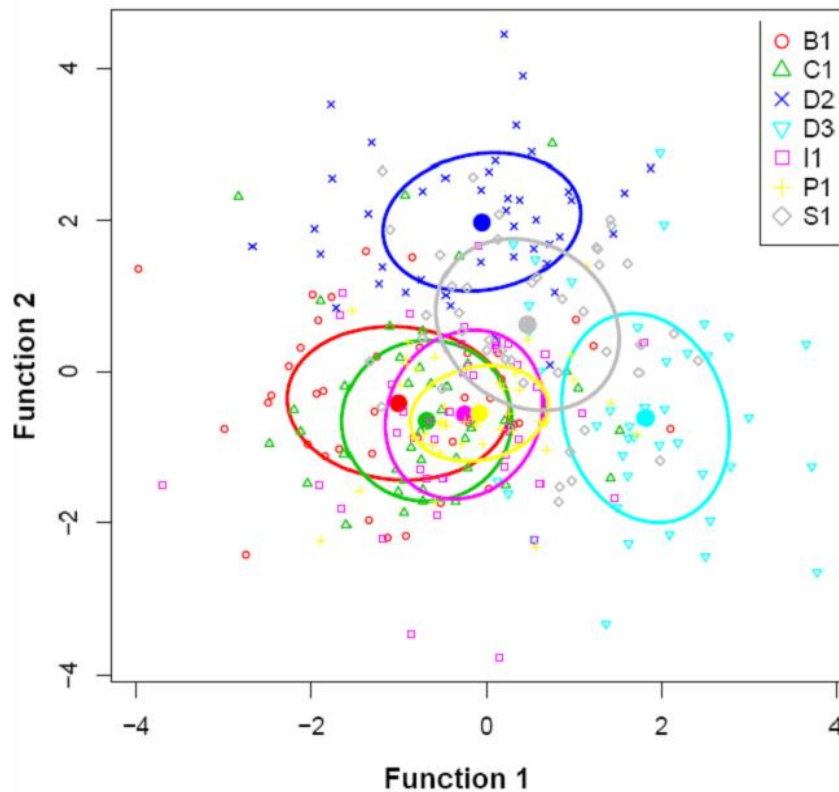


Figura 17. Diagrama de dispersión de las funciones discriminantes 1 y 2, obtenido mediante el análisis factorial discriminante, en el que se muestran los centroides de cada grupo y las elipses con un nivel de confianza del 95%.

Los caracteres excluidos del CDA fueron los correspondientes a las medidas del aparato nuclear y la ciliatura. Para comparar las diferencias entre los 7 aislados en cuanto a estos caracteres, se realizó un ANOVA, seguido de un test Tukey-HSD, en el que se compararon los distintos aislados de dos en dos (Fig. 18).

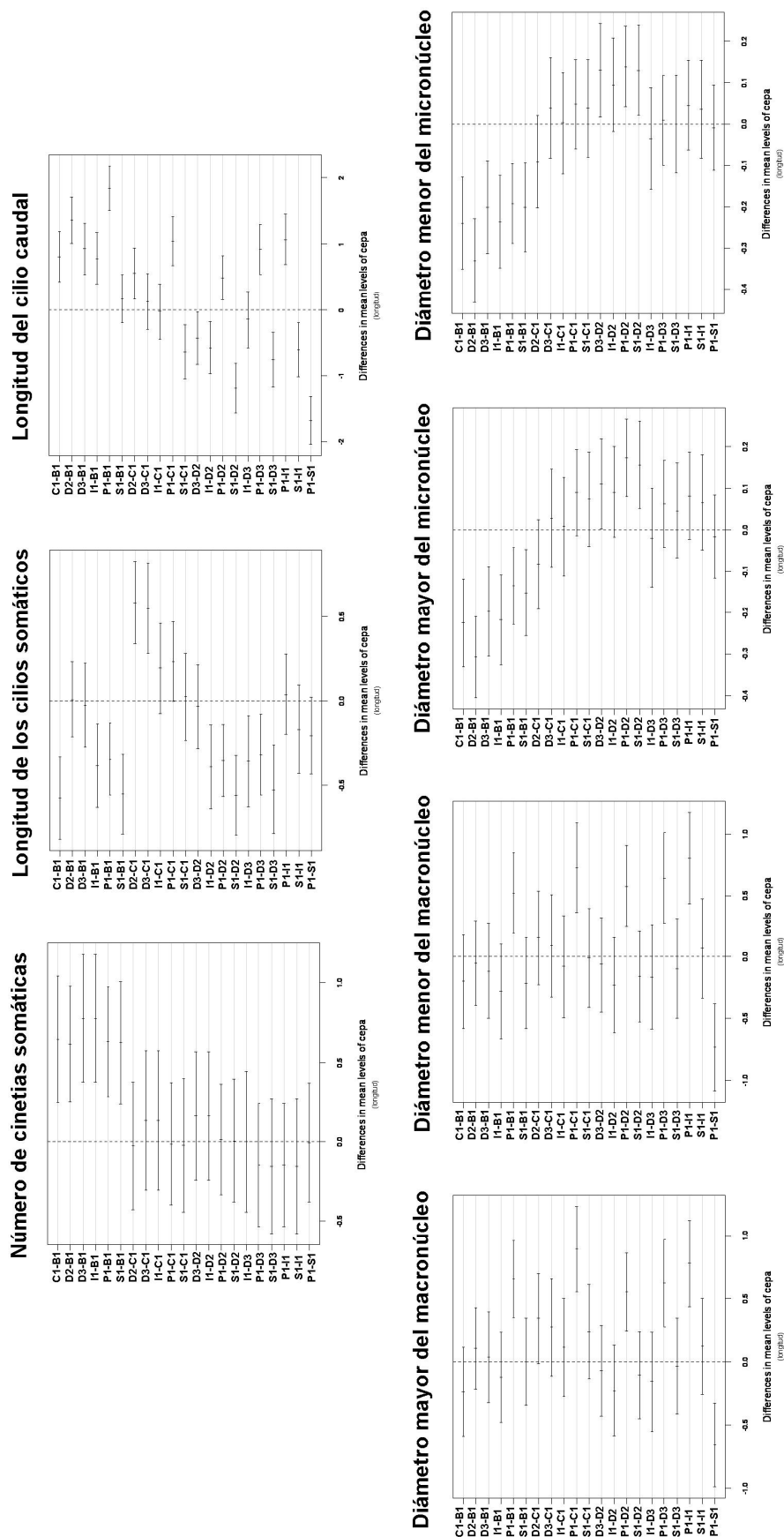


Figura 18. Representación gráfica de la comparación de los caracteres morfológicos no incluidos en el CDA, obtenida a partir de un ANOVA de una vía seguido de un análisis Tukey HSD.

Tras analizar los resultados de la comparación pareada del test de Tukey-HSD (Fig. 18), observamos que el número de cinetias somáticas no muestra diferencias entre los aislados a excepción de los pares que contienen al aislado B1, que resultó ser distinto a todos los demás para este carácter. En cuanto a la longitud de los cilios somáticos y del cilio caudal, las diferencias observadas entre los distintos pares nos permiten extraer dos grupos: uno que contiene los aislados B1, D2 y D3, y otro que contiene los aislados restantes. El diámetro mayor, tanto del micronúcleo como del macronúcleo, parece ser un poco menos variable que el diámetro menor. Con respecto al micronúcleo, los aislados B1 y D2 resultaron diferentes a todos los demás, si bien parece que el aislado D2 está a medias entre el aislado B1 y los otros. El macronúcleo, sin embargo, sólo resultó diferente para el aislado P1, y sus medidas resultaron similares para los aislados restantes.

DISCUSIÓN

La mayoría de los taxonomistas utilizan la morfología para describir nuevas especies, asumiendo que si la morfología del nuevo aislado es significativamente diferente que la de todas las especies anteriormente descritas, este nuevo aislado es una nueva especie válida. Sin embargo, cada vez más, los métodos genéticos moleculares están siendo utilizados como sustitutos fiables del entrecruzamiento y las características morfológicas para establecer la distinción genética y taxonómica de los nuevos aislados. La combinación de datos morfológicos y moleculares proporciona el mejor medio de describir especies (Modeo *et al.*, 2003).

Entre los caracteres morfológicos a estudiar deben incluirse las características brutas morfológicas (forma corporal, tamaño corporal, tipo y grado de ciliación, ubicación general de la zona oral y detalles de la ciliatura oral), así como las características del cinetosoma (caracteres cualitativos como el tipo de ciliación en las cinetias o como convergen las cinetias para formar las líneas de sutura, y caracteres cuantitativos como el número total de cinetias somáticas, número de cinétidas en una cinetia particular, número de cinetias

postorales o número de cinetias somáticas en el lado izquierdo y derecho del cuerpo) y las características nucleares (forma, tamaño, número y ubicación de los micronúcleos y macronúcleos) (Corliss, 1979; Lynn, 2008).

Pocos estudios han evaluado la variación intraespecífica en ciliados, y por consiguiente el conocimiento del tema y la comprensión de los procesos que están bajo ella está limitado (Barth *et al.*, 2008; Gentekaki y Lynn, 2009). En dos parásitos ciliados de peces, *Cryptocarion irritans* e *Ichthyophthirius multifiliis*, ha sido demostrada claramente la existencia de variaciones intraespecíficas basadas en diferencias en la morfología, fisiología, infectividad, patogenicidad, y otros aspectos (Nigrelli *et al.*, 1976; Clayton y Price, 1992; Diggles y Lester, 1996; Straus y Meinelt, 2009).

Existen varios métodos para cuantificar la variación morfométrica. El CDA es una técnica multivariante de clasificación que permite diferenciar entre grupos, prestando atención a los valores que toman determinadas variables en los individuos de cada uno de los grupos, y facilitando una comparación más potente de las poblaciones. En ciliados, las técnicas morfométricas multivariantes han sido aplicadas con éxito para distinguir algunas especies crípticas o determinar especies morfológicas dentro de géneros como *Paramecium* y *Tetrahymena* (Gates y Berger, 1974; Gates *et al.*, 1975; Powelson *et al.*, 1975; Lynn, 2008).

En escuticociliados, la identificación de las diferentes especies se ha basado tradicionalmente en las características morfológicas observadas tras varios métodos de impregnación con plata (Foissner, 1991). En este trabajo hemos utilizado el método del carbonato de plata con piridina, que ofrece excelentes resultados en la tinción de estructuras ciliadas y nucleares (Augustin *et al.*, 1984).

Para investigar la existencia de variación intraespecífica, en este trabajo se estudiaron siete aislados de *P. dicentrarchi* de diferente origen geográfico, realizando un análisis estadístico integral mediante un análisis multivariante de 16 caracteres biométricos en muestras impregnadas con plata (Iglesias *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2007).

Este análisis reveló que todos los aislados poseían las características morfológicas básicas de *P. dicentrarchi* (Iglesias *et al.*, 2001). Los aislados de *P. dicentrarchi* se diferencian fundamentalmente de otra especie muy similar, *M. avidus*, en que:

- (a) Poseen entre 13-15 cinetias (Fig. 15), frente a 10-12 cinetias (raramente 13) en *M. avidus*.
- (b) Presentan una fibra circular polar que conecta la última cinetia con la fibra circular polar a nivel de las cinetias 7 u 8, mientras que en *M. avidus* esta fibra conecta la última cinetia con la fibra circular polar a nivel de las cinetias 3 y 6.
- (c) La membrana paraoral (PM) está siempre dividida en dos partes (PM1 y PM2) separadas por un espacio estrecho, mientras que en *M. avidus* la cavidad bucal está formada por una única PM que solamente alguna vez puede estar dividida en dos partes separadas por un espacio estrecho (Fig. 14).

Por otra parte, en el ciliado *Miamiensis avidus* se ha descrito la transformación de microstomas (trofontes viables) en macrostomas (Gómez-Saladín y Small, 1993b, c). Nosotros nunca hemos observado esta transformación en ninguno de los aislados examinados de *P. dicentrarchi*. En un estudio realizado con varios clones de *M. avidus*, Jung *et al.* (2007) encontraron que el aparato bucal mostraba un alto grado de variación estructural, encontrándose la membrana paraoral en forma continua y discontinua y, en un tercio de las células, ausencia del OPK3. En nuestro estudio, la estructura del aparato bucal fue constante en todos los aislados, y no se observó ningún ciliado sin OPK3 o con la membrana paraoral continua. En estudios realizados por otros autores en ciliados de *P. dicentrarchi*, se describen también PM1 y PM2 individuales (Dragesco *et al.*, 1995; Song y Wilbert, 2000; Iglesias *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004a). Jung *et al.* (2007) concluyeron tras su estudio que la variación observada entre *M. avidus* y *P. dicentrarchi* refleja una variación intraespecífica, y no es un criterio fiable para distinguir especies.

Algunos autores han sugerido la existencia de diferentes cepas en un ciliado de la familia Philasteridae (perteneciente al género *Philasterides* o *Miamiensis*), basándose en la existencia de diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones pareadas de características morfométricas, de virulencia y de cultivo *in vitro* en aislados de piscifactorías de rodaballo (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004b). Estos autores encontraron que las mayores diferencias entre aislados se encontraban en el ratio L/A, el número de cinetias somáticas, el número de cilios en cada OPK y PM, y la disposición relativa de estas estructuras en el cuerpo, mientras que la longitud del cilio caudal y la posición del CVP fueron similares.

El CDA de los datos morfométricos realizado en este estudio refleja un polimorfismo intraespecífico en los aislados de *P. dicentrarchi*. Así, se observan cuatro grupos diferenciados: uno que incluye al aislado D2, otro que incluye al aislado D3 y otro formado por los aislados B1, C1, I1 y P1 (que se solapan entre sí), mientras que el aislado S1 muestra características intermedias entre los 3 grupos, solapándose con todos. Quedó también claro a partir de este análisis que los caracteres morfológicos con la máxima habilidad para discriminar entre aislados y establecer la variabilidad intraespecífica fueron, en orden de importancia: la anchura del OPK3, la longitud de la PM2, la longitud del campo bucal, la anchura corporal, la ratio L/A, la longitud corporal, la anchura del OPK1 y la distancia entre OPK2-OPK3.

En un estudio con distintos aislados de *M. avidus*, se encontró que la OPK3 resultó ser la estructura más variable del aparato bucal, presentando una célula típica 1 o 2 filas longitudinales de cilios y de 3 a 5 cuerpos basales en esta estructura (Jung *et al.*, 2007), lo que es consistente con los resultados obtenidos en este estudio, en el que el ancho de esta estructura resultó ser el carácter más variable de todos los medidos.

Algunos autores afirman que, a pesar de que el tamaño corporal es importante, en sí mismo es rara vez suficiente para distinguir especies y, de hecho, hay muchos rasgos cuantitativos no correlacionados con el tamaño que pueden ser discriminatorios (Lynn, 2008). Sin embargo, el tamaño permite

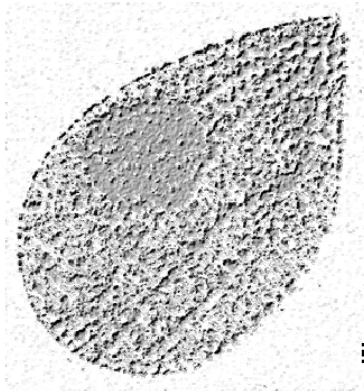
distinguir entre clones de *Styлонichia mytilus* de distintas localizaciones (Ammermann, 2008) y se encontraron también diferencias entre clones de *Coleps spetai* y *Rimostrombidium lacustri* (Weisse y Rammer, 2006).

Con relación al aparato nuclear, algunos clones de *Styлонichia lemnae* pueden distinguirse en base a peculiaridades en su micronúcleo (Ammermann *et al.*, 1989). La forma del macronúcleo, el número de CVP y la disposición de cuerpos basales en ciertas cinetias pueden servir para discriminar entre especies de *Uronychia* (Shen *et al.*, 2009) y también las especies taxonómicas de *Paramecium* muestran diferencias en la morfología y número de vacuolas contráctiles y micronúcleos (Fokin *et al.*, 2001). En el estudio del aparato nuclear de los aislados de *P. dicentrarchi*, la forma y número de los macronúcleos y micronúcleos son constantes en todos los aislados y, en cuanto a su tamaño, el diámetro mayor, tanto del micronúcleo como del macronúcleo, resultó ser menos variable que el diámetro menor, y se observaron mayores diferencias en el tamaño del micronúcleo (los aislados B1 y D2 resultaron ser distintos a los demás), mientras que sólo el macronúcleo de uno de los aislados (P1) resultó distinto. El número de CVP y su posición resultaron constantes entre todos los aislados examinados, encontrándose siempre un solo CVP posicionado al final de la 2ª cinetia somática. Sin embargo, en la descripción original de *M. avidus*, en una de las dos cepas descritas aparecen ocasionalmente 2 CVPs (Thompson y Moewus, 1964).

De acuerdo con Montagnes y Taylor (1994), el patrón de la ciliatura somática de los *Strombidium* es distintivo, pero posiblemente muestra convergencias, y por esto rechazaron el patrón ciliar como una característica distintiva a nivel de género, conclusión soportada por los análisis morfológicos de los *Strombidium* (Agatha 2004a, b). En este trabajo, se observan muchas diferencias en la longitud del cilio caudal y los cilios somáticos, pero no en el número de cinetias, que sólo muestran diferencias en uno de los aislados (B1). El estudio del aparato ciliar no parece ser válido para diferenciar entre aislados de *P. dicentrarchi*, ya que no permite obtener grupos fiables.

Los resultados aquí obtenidos demuestran la gran importancia de las características biométricas del aparato bucal en la determinación de la especie y la cepa, que ya fueron tradicionalmente establecidas como un conjunto básico para estudiar la evolución y la sistemática de los protozoos ciliados (Corliss, 1956). Sin embargo, a pesar de que las mayores diferencias entre especies del género *Mesanophrys* están en la longitud de la boca vs longitud corporal y la longitud OPK1 vs longitud OPK2 (Wiackowski *et al.*, 1999), estos autores concluyeron que los criterios morfológicos no discriminan inambiguamente entre las especies del género *Mesanophrys* y que estos datos, en ausencia de otros criterios, no justifican la distinción de las especies. Esta opinión es compartida por otros autores, como Jung *et al.*, (2007), que concluyen en su estudio morfológico con varios clones de *M. avidus* que la morfología de la membrana paraoral y las policinétidas orales no puede ser utilizada como una clave consistente para la identificación de especies.

Nuestra conclusión es que los análisis morfológicos son básicos para la identificación a nivel de especie pero, si bien pueden apoyar la asignación del aislado a una u otra cepa realizada mediante otros métodos, son demasiado ambiguos para ser considerados por sí solos.



Capítulo 2

ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS AISLADOS DE *P. dicentrarchi*

Inicialmente, hemos identificado a *P. dicentrarchi* como el principal agente etiológico de la escuticociliatosis en rodaballo cultivado, basándonos en criterios morfológicos y moleculares (Iglesias *et al.*, 2001; Paramá *et al.*, 2006); sin embargo, se ha demostrado que existe una estrecha relación filogenética entre *P. dicentrarchi* y *M. avidus* y se ha sugerido una posible sinonimia entre ambas especies (Paramá *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2007). Más recientemente, otros autores confirmaron que estos taxones son conespecíficos, es decir, que son la misma especie, considerando a *M. avidus* un sinónimo *senior* de *P. dicentrarchi* (Song y Wilbert, 2000; Jung *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009a).

La introducción de técnicas bioquímicas y moleculares, como la electroforesis enzimática, la PCR/RFLP, la diversidad de ADN, y la comparación de secuencias de la subunidad pequeña del ARN ribosómico (SSUARNr), han ayudado a resolver algunos de los problemas sistemáticos dentro del filo Ciliophora, particularmente con respecto a la separación de especies y la reconstrucción de relaciones filogenéticas (Paiva *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009). Los estudios de diversidad genética intraespecífica en ciliados están particularmente obstaculizados por la falta de marcadores de ADN apropiados (Gentekaki and Lynn, 2009). La secuenciación de los genes de la SSUARNr y de la subunidad I de la citocromo oxidasa mitocondrial (Cox1) ha sido recientemente aplicada a la identificación en infecciones de *P. dicentrarchi* (Jung *et al.*, 2005; Rossteuscher *et al.*, 2008), con el fin de investigar las relaciones filogenéticas entre este ciliado y otros miembros del orden Philasterida (Paramá *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2008), o dentro de otros géneros de ciliados parásitos (Chantangsi and Lynn, 2008), y ha sido utilizada también para investigar variaciones genéticas intraespecíficas en cepas de ciliados (Barth *et al.*, 2006). Varios autores han demostrado que el polimorfismo de la región codificante del gen de la β -tubulina puede ser utilizado como marcador molecular en la identificación al nivel de especie (Luis *et al.*, 1998; Yli-Mattila *et al.*, 2004; Belbahri *et al.*, 2008).

En este estudio, se han secuenciado dos marcadores nucleares de ADN: fragmentos de las regiones codificantes del gen de la ARNr 18S (SSUARNr) (350 bp) y del gen de la β -tubulina (390 bp), así como un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I mitocondrial (Cox1) (398 bp).

RESULTADOS

Inicialmente, la distancia evolutiva entre las secuencias de los aislados se estimó en base al número de sustituciones por sitio; todos los resultados mostrados están basados en el análisis pareado (*pairwise analysis*) de las 7 secuencias mediante el método de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980). (Tabla 7).

	AISLADOS						
	B1	C1	D2	D3	I1	P1	S1
B1							
C1	0.0000						
D2	0.0000	0.0000					
D3	0.0000	0.0000	0.0000				
I1	1.1768	1.1768	1.1768	1.1768			
P1	1.1768	1.1768	1.1768	1.1768	0.0000		
S1	1.1768	1.1768	1.1768	1.1768	0.0000	0.0000	
B1							
C1	0.0366						
D2	0.0145	0.0441					
D3	0.0108	0.0404	0.0036				
I1	0.0145	0.0441	0.0072	0.0036			
P1	0.0145	0.0441	0.0072	0.0036	0.0000		
S1	0.0951	0.1241	0.0870	0.0830	0.0870	0.0870	
B1							
C1	0.0000						
D2	0.0024	0.0024					
D3	0.0024	0.0024	0.0000				
I1	0.0073	0.0073	0.0048	0.0048			
P1	0.0024	0.0024	0.0048	0.0048	0.0048		
S1	0.0073	0.0073	0.0097	0.0097	0.0097	0.0048	

Tabla 7. Estimaciones de las distancias nucleotídicas pareadas (sustituciones de bases por sitio) entre los aislados de *Philasterides dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1) en términos de las secuencias nucleotídicas de los tres genes (subunidad 18S del ARNr, subunidad I de la citocromo oxidasa y β -tubulina), calculadas mediante el modelo de dos parámetros de Kimura.

La comparación del número de sustituciones de bases por sitio en el análisis de las secuencias de los tres genes estudiados mostró que el gen de la β -tubulina tiene la distancia evolutiva más baja (número de sustituciones por nucleótido, *d*) entre los aislados de *P. dicentrarchi* investigados, seguido por los genes Cox1 y ARNr 18S (Tabla 7 y Fig. 22). Cuantitativamente, la media de la *d* entre los siete aislados de *P. dicentrarchi* fue 0,6725 para el gen ARNr 18S, 0,0406 para el gen de la Cox1 y 0,0049 para el gen de la β -tubulina (Tabla 7).

```

B1      -GATCAATGAAGACCGGTCTAGCTTTGCAAGCGGATGCATACACCAC---AGCTTGACCG 56
C1      -GATCAATGAAGACCGGTCTAGCTTTGCAAGCGGATGCATACACCAC---AGCTTGACCG 56
D2      TGAGAAACGGTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTC 60
D3      TGAGAAACGGTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTC 60
I1      TGAGAAACGGTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTC 60
P1      -GATCAATGAAGACCGGTCTAGCTTTGCAAGCGGATGCATACACCAC---AGCTTGACCG 56
S1      TGAGAAACGGTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTC 60
          **  **  *      *      *****      *      *****  *      **  **  *      **      *  *  *  *  *

B1      AAGCCAGAACTGGGCACATGCAGAAGTTCAA-----CTACGAGCTTTTTTA-ACTGCAACA 110
C1      AAGCCAGAACTGGGCACATGCAGAAGTTCAA-----CTACGAGCTTTTTTA-ACTGCAACA 110
D2      AGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACCTGGGGGCCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATG 120
D3      AGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACCTGGGGGCCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATG 120
I1      AGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACCTGGGGGCCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATG 120
P1      AAGCCAGAACTGGGCACATGCAGAAGTTCAA-----CTACGAGCTTTTTTA-ACTGCAACA 110
S1      AGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACCTGGGGGCCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATG 120
          *  *      *  *  *  *      *  *      *  *      *      *      *      *      *      *      *      *

B1      ACTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCC-CT 169
C1      ACTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCC-CT 169
D2      AGAACAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGG-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 179
D3      AGAACAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGG-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 179
I1      AGAACAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGG-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 179
P1      ACTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCC-CT 169
S1      AGAACAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGG-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 179
          *      ***  **  *  *  *  *  *      *****  *  *  *  *      *      *      *      *

B1      CCAATTGTTCTCGTTAAGTCGTTTAAATTGTTCTCATTACAATCCCCTAAGGCCGTGAG 229
C1      CCAATTGTTCTCGTTAAGTCGTTTAAATTGTTCTCATTACAATCCCCTAAGGCCGTGAG 229
D2      GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA-AAGCTCGTAG- 237
D3      GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA-AAGCTCGTAG- 237
I1      GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA-AAGCTCGTAG- 237
P1      CCAATTGTTCTCGTTAAGTCGTTTAAATTGTTCTCATTACAATCCCCTAAGGCCGTGAG 229
S1      GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA-AAGCTCGTAG- 237
          *  *      *****      *  *  *  *      *      *      *      *      *      *      *

B1      GCCCCCAGGTTGTTATTTCTTGTCACCTCCCTGAATCAGGATTGGGTAATTTACGCG 289
C1      GCCCCCAGGTTGTTATTTCTTGTCACCTCCCTGAATCAGGATTGGGTAATTTACGCG 289
D2      ----TTGAACTTCTGCATGTGCCAGTTCTGGCTTCGGTCAAGCT--GTGGTGTATGCA 290
D3      ----TTGAACTTCTGCATGTGCCAGTTCTGGCTTCGGTCAAGCT--GTGGTGTATGCA 290
I1      ----TTGAACTTCTGCATGTGCCAGTTCTGGCTTCGGTCAAGCT--GTGGTGTATGCA 290
P1      GCCCCCAGGTTGTTATTTCTTGTCACCTCCCTGAATCAGGATTGGGTAATTTACGCG 289
S1      ----TTGAACTTCTGCATGTGCCAGTTCTGGCTTCGGTCAAGCT--GTGGTGTATGCA 290
          *  *      *  *      *  *  *  *      *  *      *      *      *      *      *

B1      CCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTACCGTTTCTCA 324
C1      CCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTACCGTTTCTCA 324
D2      TCCGCTTGCAAAGCTAGACCGGTCTTCATTGATC- 324
D3      TCCGCTTGCAAAGCTAGACCGGTCTTCATTGATC- 324
I1      TCCGCTTGCAAAGCTAGACCGGTCTTCATTGATC- 324
P1      CCTGCTGCCTTCCTTAGATGTGGTACCGTTTCTCA 324
S1      TCCGCTTGCAAAGCTAGACCGGTCTTCATTGATC- 324
          *  ***  *      *****      *      *  *  *  *

```

Figura 19. Alineamientos de las secuencias del gen ARNr 18S de los 10 aislados de *Philasterides dicentrarchi*, obtenidos con el programa ClustalW v 2.0.12.

```

B1 TCCTACCACGG--ACTCTGATTTACAATTAGAAAGAATCAACGTTTACTATAACGAAGCT 58
C1 -CCTACCACGGAGACTCTGATTTACAATTAGAAAGAATCAACGTTTACTATAACGAAGCT 59
D2 -CCTACCACGGAGACTCTGATTTACAATTAGAAAGAATCAACGTTTACTATAACGAAGCT 59
D3 TCCTACCACGGGACTCTGATTTACAATTAGAAAGAATCAACGTTTACTATAACGAAGCT 60
I1 -CCTACCACCG-GACTCTGATTTACAATTAGAAAGAATCAACGTTTACTATAACGAAGCT 58
P1 -CCTACCACCCCCCTCTGATTTACAATTAGAAAGAATCAACGTTTACTATAACGAAGCT 59
S1 TCCTACCACGGAGACTCTGATTTACAATTAGAAAGAATCAACGTTTACTATAACGAAGCT 60
    *****

B1 ACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTACCATGGAT 118
C1 ACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTACCATGGAT 119
D2 ACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTACCATGGAT 119
D3 ACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTACCATGGAT 120
I1 ACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTACCATGGAT 118
P1 ACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTACCATGGAT 119
S1 ACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTACCATGGAT 120
    *****

B1 TCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGTAATAATTAATA 178
C1 TCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGTAATAATTAATA 179
D2 TCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGTAATAATTAATA 179
D3 TCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGTAATAATTAATA 180
I1 TCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGTAATAATTAATA 178
P1 TCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGTAATAATTAATA 179
S1 TCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGTAATAATTAATA 180
    *****

B1 AAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAAATTAATAATT 238
C1 AAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAAATTAATAATT 239
D2 AAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAAATTAATAATT 239
D3 AAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAAATTAATAATT 240
I1 AAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAAATTAATAATT 238
P1 AAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAAATTAATAATT 239
S1 AAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAAATTAATAATT 240
    *****

B1 AAATAGCGTTTTTCGGATAAACCCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTGA 298
C1 AAATAGCGTTTTTCGGATAAACCCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGA 299
D2 AAATAGCGTTTTTCGGATAAACCCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGA 299
D3 AAATAGCGTTTTTCGGATAAACCCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTGA 300
I1 AAATAGCGTTTTTCGGATAAACCCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGA 298
P1 AAATAGCGTTTTTCGGATAAACCCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTGA 299
S1 AAATAGCGTTTTTCGGATAAACCCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTGA 300
    *****

B1 AGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTGAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGA 358
C1 AGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTGAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGA 359
D2 AGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTGAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGA 359
D3 AGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTGAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGA 360
I1 AGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTGAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGA 358
P1 AGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTGAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGA 359
S1 AGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTGAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGA 360
    *****

B1 TTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAAGCTGGATCCGGAAT 415
C1 TTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAAGCTGGATCCGGAAT 416
D2 TTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAAGCTGGATCCGGAAT 416
D3 TTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAAGCTGGATCCGGAAT 417
I1 TTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAAGCTGGATCCGGAAT 415
P1 TTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAAGCTGGATCCGGAAT 416
S1 TTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAAGCTGGATCCGGAAT 417
    *****

```

Figura 20. Alineamientos de las secuencias de la β -tubulina de los 10 aislados de *Philasterides dicentrarchi*, obtenidos con el programa ClustalW v 2.0.12.

```

B1 -TTTTTTAAGGAGACTCTTTAAGATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATG 59
C1 -TTTTTTAAGGAGACTCTTTAAGATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATG 59
D2 -TTTTTTAAGGAGACTCTTTAAGATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATG 59
D3 TTTTTTAAAGGAGACTCTTTAAGATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATG 60
I1 TTTTTTAAAGGAGACTCTTTAAGATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATG 60
P1 -TTTTTTAAGGAGACTCTTTAAGATATTTACAAGTTATTAC--CGCATGAT--AAGTAGG 55
S1 -TTTTTTAAGGAGACTCTTTAAGATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATG 59
    *****

B1 GTATTCTTTGTTGTAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTAC 119
C1 GTATTTTTTGTGTTAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTAC 119
D2 GTATTTTTTGTGTTAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTAC 119
D3 GTATTCTTTGTTGTAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTAC 120
I1 GTATTCTTTGTTGTAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTAC 120
P1 TAATTCTTTGTTGTAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTAC 115
S1 GTATTCTTTGTTGTAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTAC 119
    ***

B1 CATATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTTGAATTCAA 179
C1 CATATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTTGAATTCAA 179
D2 CATATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTTGAATTCAA 179
D3 CATATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTTGAATTCAA 180
I1 CATATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTTGAATTCAA 180
P1 CATATTGGTTCTAAA-ATGTGGCTTACCCTAGACTAAATTGTATAGTTTTTTTAATTCAA 175
S1 CATATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTTGAATTCAA 179
    *****

B1 CCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGCCACAATACTGAAGATAC 239
C1 CCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAACATAGCATTTTTAAGGCCACAATACTGAAGATAC 239
D2 CCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGCCACAATACTGAAGATAC 239
D3 CCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGCCACAATACTGAAGATAC 240
I1 CCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGCCACAATACTGAAGATAC 240
P1 CCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCCAAAATA-CCCTTCCCGGCCTCATTACTGAAGATAC 235
S1 CCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGCCACAATACTGAAGATAC 239
    *****

B1 TACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTTGATAAAAGTAACAAT 287
C1 AACTATATACCTTCTTACTATTTTCCTTTACTTGATCCAAGTACTAAC 287
D2 TATGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTTGATAAAAGTAATAAT 287
D3 TACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTTGATAAAAGTAATAAT 288
I1 TACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTTGATAAAAGTAATAAT 288
P1 TACAATAAAGCTTCTTACTCTTTTCCTTTACTTGTTAAAAG-AATAAT 284
S1 TACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTTGATAAAAGTAATAAT 287
    *

```

Figura 21. Alineamientos de las secuencias de la Cox1 de los 10 aislados de *Philasterides dicentrarchi*, obtenidos con el programa ClustalW v 2.0.12.

Como una aproximación inicial para estudiar la estructura genética dentro de los aislados del escuticociliado, se examinaron las frecuencias relativas y número de haplotipos entre ellos (Tabla 8). La comparación de las secuencias del gen de la ARNr 18S revela dos haplotipos diferentes, uno que contiene los aislados I1, D2, D3 y S1, y el otro con los aislados B1, C1 y P1 (Tabla 8). En contraste, el análisis de los genes Cox1 y β -tubulina en los 7 aislados genera 6 haplotipos distintos, con dos de los aislados pertenecientes a un mismo haplotipo: los I1 y D3 (para el gen de la Cox1) y los aislados C1 y D2 (para el gen de la β -tubulina) (Tabla 8).

Gen	Nº	Aislados	Frec.	s.d.
18 S rRNA	1	I1,D2, D3, S1	0.571	0.202
	2	B1, C1, P1	0.429	0.202
Cox1	1	D2	0.143	0.143
	2	C1	0.143	0.143
	3	B1	0.143	0.143
	4	S1	0.143	0.143
	5	I1, D3	0.286	0.184
	6	P1	0.143	0.143
β -tubulina	1	S1	0.143	0.143
	2	B1	0.143	0.143
	3	D2,C1	0.286	0.184
	4	I1	0.143	0.143
	5	D3	0.143	0.143
	6	P1	0.143	0.143

Tabla 8: Frecuencias relativas y número de haplotipos detectados en los genes de la subunidad 18S del ARNr, subunidad I de la citocromo oxidasa (Cox1) y β -tubulina, de los siete aislados de *P. dicentrarchi*.

La filogenia construida en base a los fragmentos de estos 3 genes, realizada mediante el método del vecino más próximo (*Neighbour-joining*, NJ) se muestra en la figura 19. Para el gen ARNr 18S, los aislados de *P. dicentrarchi* se agruparon en dos grupos (Fig. 22A); sin embargo, dado que la d entre los aislados fue >1 (Tabla 7), el árbol filogenético estimado podría no ser muy fiable (Fig. 22A). Cuando se utilizaron las secuencias nucleotídicas de los amplicones correspondientes a los genes de la Cox1 y la β -tubulina, los aislados fueron agrupados en 6 grupos (Fig. 22B, C), en los cuales los aislados

I1 y D3 mostraron una estrecha relación filogenética en el caso del gen de la Cox1 (Fig. 22B), mientras que los aislados C1 y D2 manifestaron una estrecha relación filogenética para el gen de la β -tubulina (Fig. 22C).

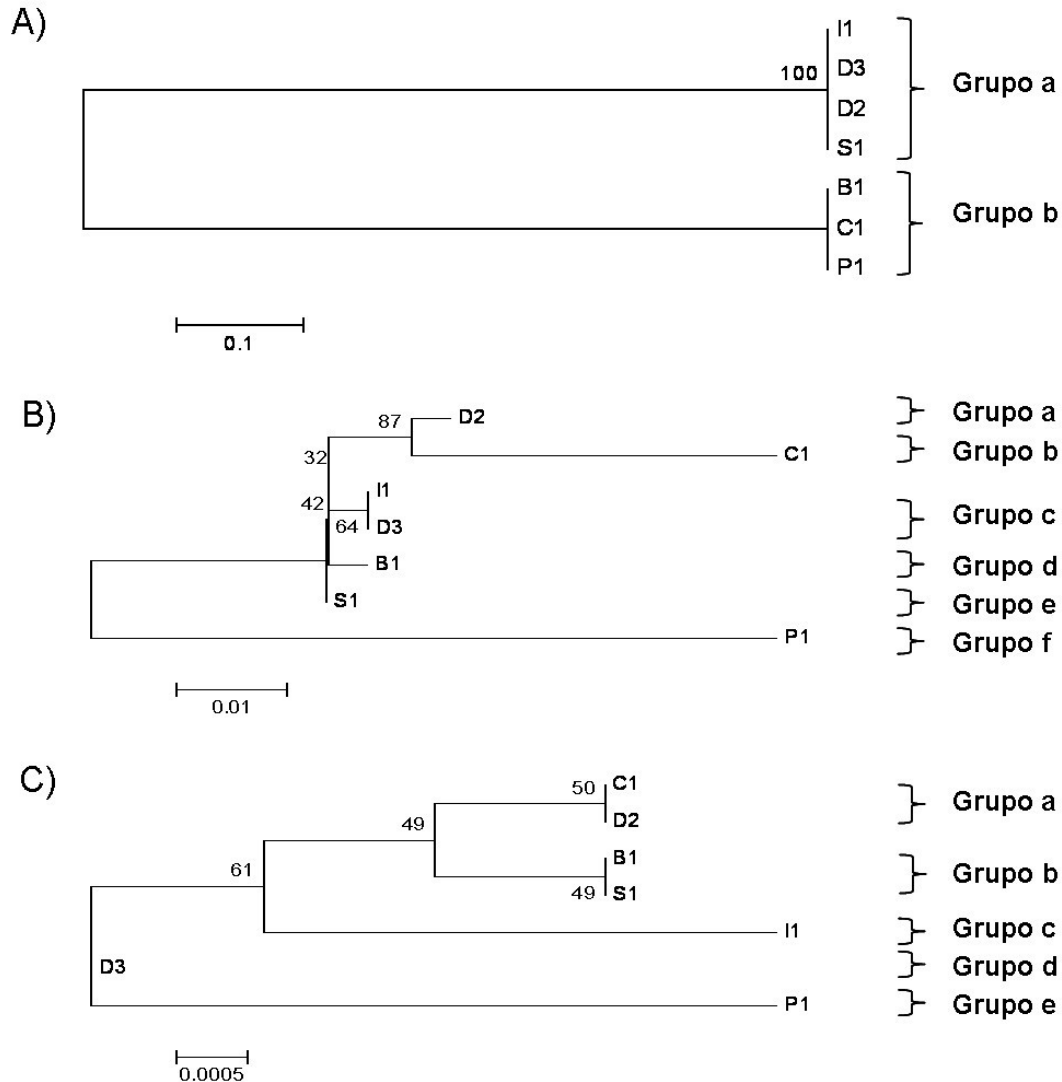


Figura 22. Árboles que muestran las relaciones filogenéticas entre los aislados de *P. dicentrarchi*, inferidos a partir de las secuencias de los genes 18S ARNr (A), subunidad I de la citocromo oxidasa mitocondrial (B) y β -tubulina (C). En cada nodo se indican los valores de *bootstrap* para 1000 réplicas, y las barras de escala indican la distancia entre los aislados.

El plegamiento del ARN y las estructuras secundarias que presentan los ARNs de los aislados de *P. dicentrarchi* se generaron con el programa DAMBE. Las figuras 23-25 muestran las estructuras consensuadas del ARN de los tres genes estudiados.

Con respecto al gen ARNr 18S (Fig. 23), se detectaron dos patrones conservados de estructura secundaria del ARN: una que incluye los aislados I1, D2, D3 y S1, y la otra que comprende los aislados B1, C1 y P1.

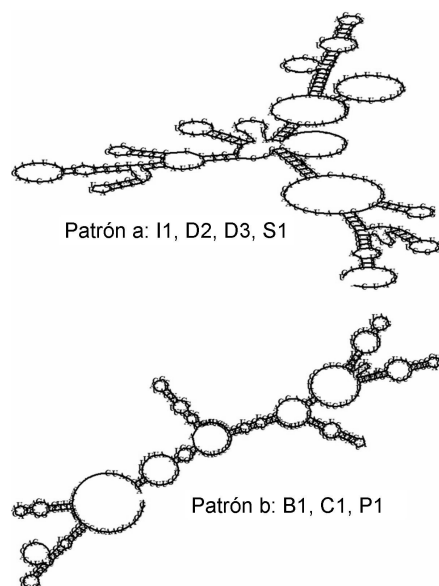


Figura 23. Predicciones de las estructuras secundarias conservadas del ARN del gen ARNr 18S para los siete aislados de *P. dicentrarchi*. El alineamiento y consenso de las secuencias de estudio se llevó a cabo con el programa Clustal W.

En relación al gen de la Cox1 (Fig. 24), se encontraron dos patrones conservados de estructura secundaria del ARN ligeramente distintos. Cuatro de los aislados están incluidos en el primer patrón, dos de ellos (B1 y C1) con similares estructuras secundarias de ARN, mientras que los aislados D3 y I1 muestran el mismo patrón, que difiere levemente del de los otros dos aislados en la estructura de la hélice terminal. El segundo patrón de estructura secundaria del ARN para el gen de la Cox1 incluye los aislados C1, D2 y P1, que tienen un patrón de plegamiento similar, si bien todos presentan posiciones diferentes de las hélices posteriores y, en el caso del aislado P1, también diferencias en la hélice anterior.

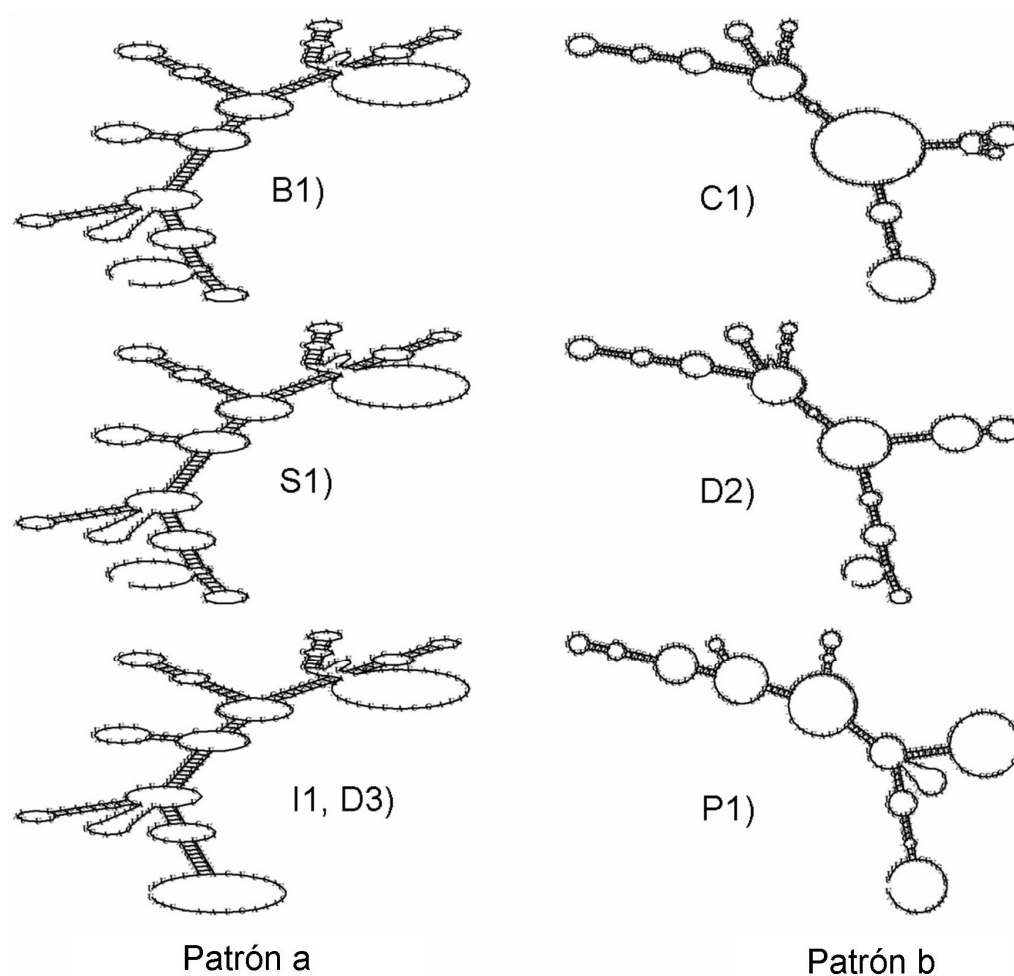


Figura 24. Predicciones de las estructuras secundarias conservadas del ARN del gen de la citocromo oxidasa I (Cox1) para los siete aislados de *P. dicentrarchi*. El alineamiento y consenso de las secuencias de estudio se llevó a cabo con el programa Clustal W.

Finalmente, el gen de la β -tubulina (Fig. 25) presenta un único patrón de plegamiento del ARN, con una estructura secundaria muy similar para los aislados C1, D2 y S1, y levemente distinta para los aislados B1, D3 y P1, especialmente en el plegamiento en la posición terminal de la molécula, mientras que el aislado I1 muestra un plegamiento distinto en la región inicial de la molécula de ARN.

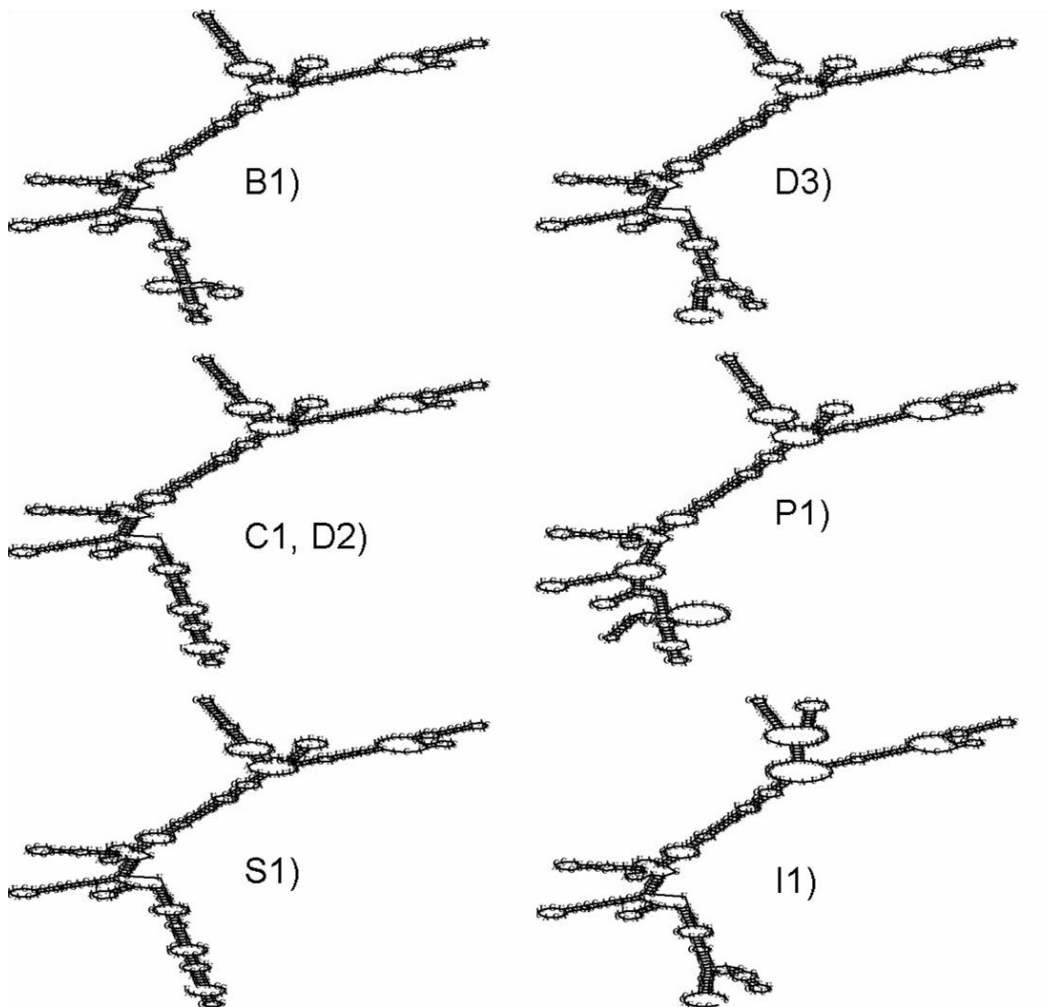


Figura 25. Predicciones de las estructuras secundarias conservadas del ARN del gen de la β -tubulina para los siete aislados de *P. dicentrarchi*. El alineamiento y consenso de las secuencias de estudio se llevó a cabo con el programa Clustal W.

DISCUSIÓN

En años recientes, la disponibilidad de un número de marcadores moleculares hizo posible un análisis de las relaciones entre protozoos que no había sido posible utilizando sólo los caracteres morfológicos. Al evaluar la variación genética intraespecífica, es importante establecer marcadores correctos para los organismos bajo investigación (Gentekaki y Lynn, 2009).

En ciliados, los marcadores nucleares como los ITS1 y ITS2, y las regiones hipervariables de la LSUARNr han sido los más comúnmente

utilizados; sin embargo, el ADN mitocondrial ha sido raramente aplicado como marcador genético en ciliados (Barth *et al.*, 2006; 2008; Gentekaki y Lynn, 2009; Segade *et al.*, 2009), mientras que los genes de la α - y β -tubulina han sido utilizados ocasionalmente para esclarecer la posición filogenética y los fenómenos epigenéticos en ciliados (Fast *et al.*, 2002; Nishi *et al.*, 2005; Robinson y Katz, 2007). Los estudios de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) han sido también utilizados para investigar la variación genética intraespecífica en poblaciones de ciliados del suelo o de agua dulce (Foissner *et al.*, 2001; Kusch, 1998).

La comparación de secuencias de ARNr es particularmente útil para inferir relaciones filogenéticas, debido a su alto porcentaje de secuencias invariantes y estructuras secundarias conservadas que hacen posible alinear correctamente nucleótidos homólogos (James *et al.*, 1989; Lane *et al.*, 1985; Sogin *et al.*, 1971; Ye y Romero, 2002). Aunque sólo algunas especies han sido examinadas mediante técnicas moleculares, los estudios moleculares de la secuencia de la subunidad pequeña del ARNr confirman la clasificación propuesta para la subclase Scuticociliatia (Lynn y Strüder-Kypke, 2005; Miao *et al.*, 2004; Shang *et al.*, 2003, 2006; Yi *et al.*, 2010). Sin embargo, las comparaciones entre los diferentes estudios revelan que hay mucha confusión sobre la filogenia y evolución de los taxones dentro de esta subclase.

Por encima del nivel de especie, parece que por el momento, a juzgar por su acuerdo con la morfología, los genes del ARNr son los más fiables para las relaciones filogenéticas profundas, en contraste con las actinas (Philippe *et al.*, 1994) y tubulinas (Israel *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2007), que no proporcionan los mismos clados principales que la morfología.

Con el fin de identificar un marcador genético variable para las relaciones intraespecíficas en los aislados de *P. dicentrarchi*, en este estudio se desarrollaron cebadores de PCR para los genes nucleares de la ARNr 18S y la β -tubulina, y para el gen mitocondrial de la Cox1 de este escuticociliado. La divergencia entre los aislados de *P. dicentrarchi* fue mucho más limitada cuando se utilizó el gen de la ARNr 18S, el marcador genético más comúnmente

utilizado en ciliados (Barth *et al.*, 2008). En los siete aislados de *P. dicentrarchi* de este estudio, se encontraron dos haplotipos del gen de la ARNr 18S y seis haplotipos de los genes de la Cox1 y β -tubulina.

Investigaciones recientes han mostrado que el gen de la ARNr 18S no es apropiado como marcador para la variación intraespecífica en ciliados debido a su limitada variabilidad a este nivel (Stoeck *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2006, Barth *et al.*, 2008). La tubulina es una proteína estructural altamente conservada, y sus regiones implicadas en la polimerización y unión de nucleótidos están bien conservadas en los eucariotas. A bajo nivel taxonómico, el análisis genético en especies de la clase Spirotrichea mostró que existe un buen consenso entre los datos de proteínas y los datos sistemáticos (Schmidt *et al.*, 2007). En esta clase, parece que los datos de secuencias del ARNr no se correlacionan con los datos ultraestructurales de organización del córtex y desarrollo de las redes microtubulares, correlación que sí existe cuando se utilizan las secuencias de la tubulina (Fleury *et al.*, 1992). Los genes de la β -tubulina han resultado ser útiles para analizar la diversidad genética intraespecífica entre varias cepas de protozoos (Mendoza-León *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2006). Sin embargo, otros estudios describen genealogías de ciliados inconsistentes cuando se utilizan genes codificantes de proteínas, incluyendo la β -tubulina (Fast *et al.*, 2002; Zufall y Katz, 2007).

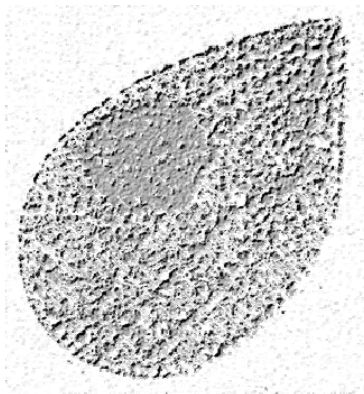
La elevada variación del gen de la Cox1 en ciliados es bien conocida, y ha sido utilizada para estudiar la variación genética intraespecífica en varias especies de ciliados (Barth *et al.*, 2006; Gentekaki y Lynn, 2009). Así, la Cox1 ha sido utilizada para separar varias especies de *Paramecium*, con divergencias interespecíficas que oscilan entre el 12 y el 27% (Barth *et al.*, 2006), obteniéndose niveles de divergencia similares entre especies de *Tetrahymena* que eran idénticas basándose en la secuencia del gen SSUrRNA (Lynn y Strüder-Kypke, 2006; Chantangsi *et al.*, 2007). En su estudio, Chantangsi *et al.* (2007) concluyeron que este gen podrá ser una alternativa en la identificación biológica de ciliados, especialmente en aquellos cuyos SSUrRNAs son idénticos o muy similares, ya que las secuencias del SSUrRNA no son suficientemente

variables para diferenciar ciliados tetrahiménidos, especialmente en especies estrechamente relacionadas.

Varios estudios han demostrado la utilidad de las predicciones de las estructuras secundarias del ARN en análisis filogenéticos (Gillespie *et al.*, 2005) y en estudios de diversidad genética intraespecífica en ciliados (Coleman, 2005). Hemos construido las estructuras secundarias conservadas del ARN de los tres genes (ARNr 18S, Cox1 y β -tubulina) para los siete aislados de *P. dicentrarchi*, que se predicen como estructuras de mínima energía por medio de técnicas de programación dinámica (Hofacker *et al.*, 1998); este algoritmo se utiliza de manera eficaz en el Viena RNA Package (Hofacker, 2003; Gruber *et al.*, 2008), originalmente propuesto por Zuker y Stiegler (1981). Los ARN ribosómicos consisten en mosaicos de regiones de dominios conservados y dominios variables. Mientras que las secuencias primarias del ARNr pueden haber cambiado mucho, la estructura secundaria está más conservada (Michot *et al.*, 1990); posiblemente, debido a que pueden jugar un papel importante en la evolución, las características estructurales del ARNr podrían ser útiles como caracteres codificados independientes para el análisis cladístico (Caetano-Anollés, 2002). En el presente estudio, el análisis de las predicciones de las estructuras secundarias conservadas del ARN de los siete aislados de *P. dicentrarchi* generó dos clústeres y dos patrones diferentes de plegamiento para el gen ARNr 18S, y seis clústeres y dos patrones de plegamiento para el gen de la Cox1. En los transcritos del ARN de la Cox1, la mayor parte de la variación en la secuencia de los aislados de *P. dicentrarchi* se encontró en la posición distal de la hélice de ARN. Finalmente, el gen de la β -tubulina generó un único patrón de plegamiento, pero con diferencias en su estructura molecular, lo que clasificó los aislados en seis grupos.

En resumen, en este estudio hemos demostrado la existencia de una variación genética intraespecífica a partir de los árboles filogenéticos construidos a partir de las secuencias de los genes de la ARNr 18S, Cox1 y β -tubulina de siete aislados de *P. dicentrarchi* de distinto origen geográfico, y se ha mostrado que el gen mitocondrial de la Cox1 y el gen nuclear de la β -

tubulina son buenos marcadores para detectar nuevas cepas de este ciliado. Además, los resultados también indican la utilidad de las predicciones de las estructuras secundarias del ARN para los genes de la Cox1 y de la β -tubulina en la identificación de cepas de *P. dicentrarchi*, y su capacidad para detectar variabilidad intraespecífica dentro de este escuticociliado. El alto grado de variación intraespecífica en el gen de la β -tubulina en los distintos aislados de *P. dicentrarchi* podría indicar la existencia de cepas con diferencias antigénicas en estas moléculas, que deberían ser tenidas en cuenta en el desarrollo de una vacuna para el control de la escuticociliatosis en el rodaballo.



Capítulo 3

ANÁLISIS SEROLÓGICO Y DE PROTECCIÓN CRUZADA DE LOS AISLADOS DE *P. dicentrarchi*

El serotipo del ciliado está principalmente definido a través del uso de técnicas inmunológicas y depende de una cierta clase de proteínas distribuidas a todo lo largo de la superficie de la membrana externa y los cilios (Beale y Mott, 1962; Doerder, 1981; Kusch y Schmidt, 2001). Estos antígenos se utilizan para caracterizar diferentes serotipos, ya que bajo condiciones estacionarias sólo se expresa un tipo de antígeno (Antony y Capdeville, 1989; Momayezi *et al.*, 2004). Los antígenos de superficie están implicados en los mecanismos de defensa de protozoos de vida libre (Harumoto y Miyake, 1993; Nagamune *et al.*, 2000). Se han descrito cepas serotípicas de *I. multifiliis* en base a la presencia de proteínas de superficie específicas (Dickerson *et al.*, 1993).

Nuestro grupo ha demostrado recientemente que una vacuna que contiene un aislado de *P. dicentrarchi* es capaz de producir un alto grado de protección frente a ese aislado en el rodaballo (Lamas *et al.*, 2008; Sanmartín *et al.*, 2008). Otros autores han desarrollado una vacuna con una mezcla de tres aislados del escuticociliado de distintos orígenes, que produjo un cierto grado de protección tras el reto con uno de los aislados (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008). Hasta la fecha, no hay evidencia de que exista una vacuna que pueda proteger frente a diferentes aislados de *P. dicentrarchi*. Los rodaballos vacunados con los distintos aislados mostraron diferentes niveles de protección, y la protección efectiva sólo se consiguió cuando se usó el mismo aislado en la vacunación y en el reto (Piazzon *et al.*, 2008), lo que parece indicar que existen diferencias en los antígenos protectores entre cepas. En el presente trabajo, se han investigado las diferencias antigénicas entre varios aislados y las diferencias en protección frente a los mismos, así como la correlación entre ellas.

RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA EN AISLADOS DE *P. dicentrarchi*

Para la caracterización antigénica de los aislados de *P. dicentrarchi* se han utilizado dos tipos de antígenos: extractos totales y antígenos de membrana purificados, extractos totales y antígenos nucleares, que se separaron en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras o no reductoras. Los patrones de reconocimiento antigénico se obtuvieron mediante Western blot, enfrentando estos antígenos con sueros anti-aislado (obtenidos tras la inmunización con vacunas que contenían el ciliado entero) o sueros anti-membrana (obtenidos tras la inmunización con vacunas que contenían los antígenos de membrana de los aislados), utilizando sueros obtenidos en ratón y en rodaballo inmunizados.

3.1.1. Diferencias antigénicas en los extractos totales entre aislados de *P. dicentrarchi*

Se han analizado las diferencias antigénicas en los extractos totales de los siete aislados, frente a los sueros de ratón anti-aislado.

El aislado D2 muestra una banda de unos 50 kDa (asterisco en Fig. 26B), reconocida por el antisuero homólogo, que no aparece en los otros aislados, y marca además otras bandas en los antígenos totales de los aislados B1, D3, P1 y S1 (flecha en Fig. 26B). El suero anti-B1 reconoce una banda ancha de 28 kDa en el antígeno total del aislado B1 (cuadrado punteado, Fig 26A), y el suero anti-I1 reconoce una banda del mismo peso molecular en el aislado homólogo (asterisco, Fig. 26D).

El resto de los aislados presentan una banda de 34 kDa, visible al utilizar el suero anti-D3 (Fig. 26C). En general, los aislados D3, P1 y S1 comparten varias bandas, especialmente evidentes en la zona de 30-34 kDa, lo que sugiere un enorme parecido en el contenido antigénico de los extractos totales en estos aislados (Fig. 26). A partir de las diferencias en el reconocimiento antigénico entre los aislados en la zona de 30-34kDa, se evidencia que esa zona comprende realmente 4 bandas (denominadas con las letras a, b, c y d en la Fig. 26C), las

cuales no son reconocidas por los sueros anti-B1 (Fig. 26A), anti-C1 y anti-D2 (Fig. 26B), y sí por los cuatro sueros restantes, en mayor o menor medida. La ausencia o presencia de estas bandas según el reconocimiento del suero anti-D3 (Fig. 26C) nos permite diferenciar a los aislados en grupos: los antígenos D3, P1 y S1 muestran las 4 bandas (que aparecen solapadas como una banda ancha), mientras que el antígeno I1 muestra todas excepto la banda c; el antígeno B1 muestra las bandas b y d, el antígeno C1 muestra las bandas a y b y, por último, el antígeno D2 no parece poseer ninguna de estas bandas. El suero anti-I1 no reconoce estas bandas en su antígeno homólogo, aunque sí en los antígenos de los aislados D3, P1 y S1 (flecha en la Fig. 26D) y sí reconoce, en cambio, dos bandas anchas de aproximadamente 24 y 28 kDa (asteriscos en la Fig. 26D), que no están presentes en ninguno de los otros aislados, y que no son reconocidas por los sueros anti-P1 y anti-S1 (Fig. 26E).

Sin embargo, también existen diferencias entre estos y, así, I1 muestra una intensa banda de unos 24 kDa, especialmente evidente cuando se utiliza el antisuero homólogo (asterisco, Fig. 26D).

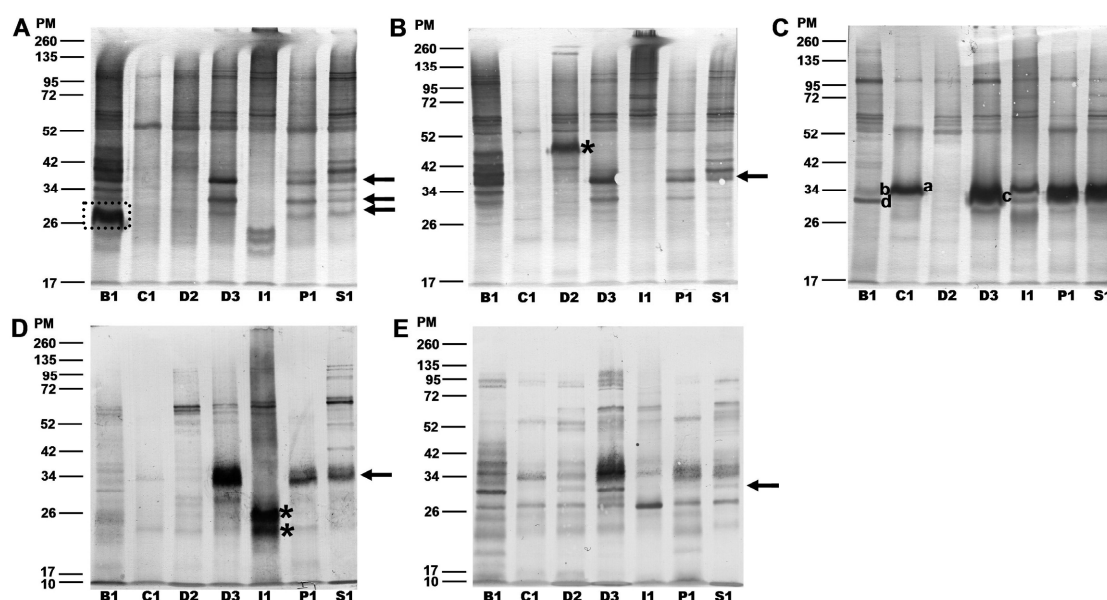


Figura 26. Patrones de reconocimiento antigénico de los extractos totales de los aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente a los aislados B1 (A), D2 (B), D3 (C), I1 (D), y S1 (E), determinados mediante Western blot y en condiciones no reductoras. Las flechas, asteriscos y letras indican bandas importantes para la caracterización. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

3.1.2. Diferencias antigénicas en las proteínas de membrana entre aislados de *P. dicentrarchi*

En los Western blot de las proteínas de membrana separadas bajo condiciones no reductoras, se observan dos bandas de 32 y 34 kDa en todos los aislados, que son reconocidas, en menor o mayor medida, por todos los sueros anti-aislado obtenidos en ratón (Fig. 27). En la zona de 40-52 kDa, los sueros anti-D3, anti-I1, anti-P1 y anti-S1 reconocen un grupo de bandas en sus antígenos homólogos (recuadro en Fig. 27B), que no aparecen en las membranas de los aislados B1, C1 y D2, ni son reconocidas por sus sueros homólogos, lo que nos separa a los aislados en dos grupos.

El suero anti-D2 marca especialmente bien una banda de 52kD en su antígeno homólogo, menos visible en otros aislados, y marca además una banda de 60kD en el aislado S1 (flechas en la Fig. 27A), aunque compartida con otros aislados, que es reconocida también por el suero anti-P1 en algunos aislados (flecha, Fig. 27C). El suero anti-D3 marca una banda de 42 kD en las membranas de los aislados C1, D3 y S1 (flecha en la Fig. 27B). Todos los sueros, excepto el anti-S1 (ver Fig A2 del Anexo 1), reconocen el mismo grupo de 3 bandas sobre los 62 kDa (flecha en la Fig. 27A), más marcadas en las membranas de los aislados C1, D2 y S1.

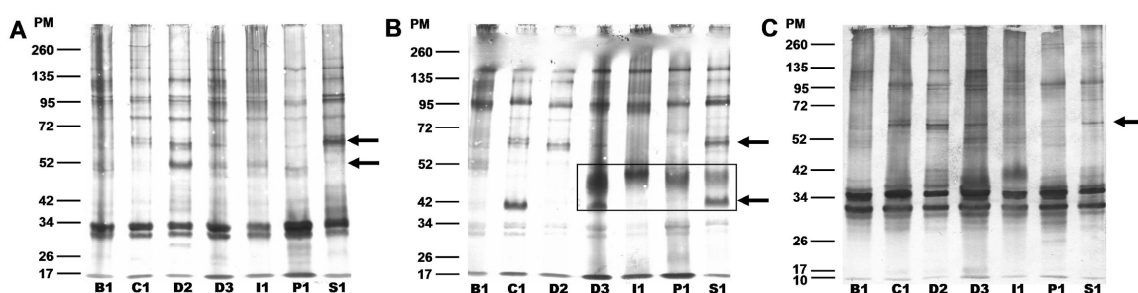


Figura 27. Patrones de reconocimiento antigénico de las muestras de membrana de los aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente al aislado D2 (A), D3 (B) y P1 (C), determinados mediante Western blot bajo y en condiciones no reductoras. Las flechas y recuadro indican bandas importantes para la caracterización. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

En condiciones reductoras se mantienen los patrones de reconocimiento observados en condiciones no reductoras, aunque con una ligera variación de los pesos moleculares, ya que las bandas reconocidas por los sueros de ratón anti-D3, anti-I1, anti-P1 (ver Fig. A3 del Anexo 1) y anti-S1 en los aislados homólogos muestran ahora un peso molecular de aproximadamente 30-34 kDa (flechas en las Figs. 28B, C y D). Además, el suero anti-S1 reconoce otra banda de tamaño más pequeño (asterisco en la Fig. 28D). Los sueros anti-B1 y anti-C1 reconocen una banda ancha en el antígeno del aislado B1 sobre los 26 kDa (asterisco en la Fig. 28A), al igual que sucedía en las muestras de extracto total.

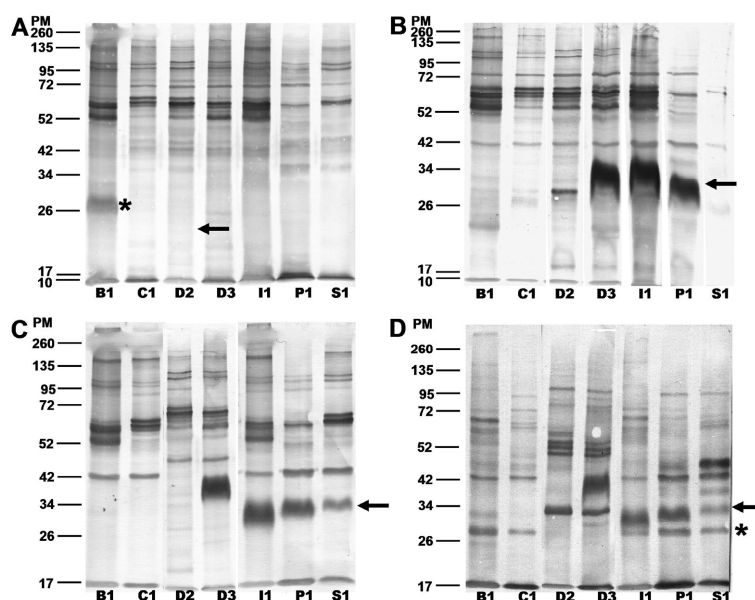


Figura 28. Patrones de reconocimiento antigénico de las muestras de membrana de los aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente al aislado B1 (A), D3 (B), I1 (C) y S1 (D), determinados mediante Western blot y en condiciones reductoras. Las flechas y asteriscos indican bandas importantes para la caracterización. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

3.1.3. Diferencias antigénicas en las muestras de membrana entre aislados de *P. dicentrarchi* utilizando sueros anti-membrana

En los Western blot de las proteínas de membrana frente a los sueros anti-membrana del ciliado obtenidos en ratón, observamos que todos los aislados comparten la banda de 34 kDa (flecha en la Fig. 29A). Teniendo en cuenta el patrón de reconocimiento antigénico global de los siete sueros frente a los antígenos de los siete aislados (ver Anexo 1), es evidente que el reconocimiento de los sueros anti-C1 y anti-D2 es muy similar, así como también el de los sueros anti-D3, anti-P1 y anti-S1, mientras que el reconocimiento global de los sueros anti-B1 y anti-I1 es diferente, aunque presentan similitudes entre ellos en cuanto al reconocimiento del grupo de bandas sobre los 58 kDa (recuadro en Fig. 29A).

La muestra del aislado P1 posee una banda de aproximadamente 24 kDa, reconocida en mayor o menor medida por todos los sueros, que no parece estar presente en ninguno de los antígenos de los otros aislados (asterisco en la Fig. 29B).

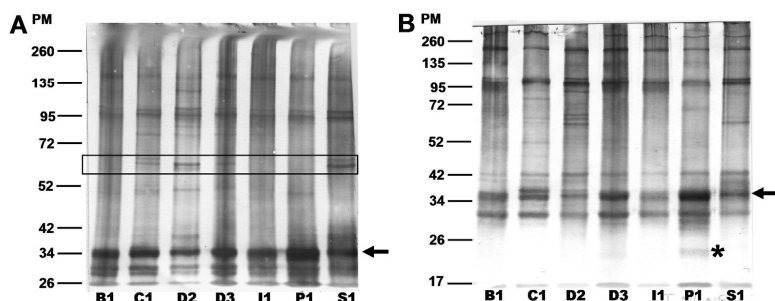


Figura 29. Patrones de reconocimiento antigénico en las muestras de membrana de los aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente al antígeno de membrana de los aislados C1 (A) e I1(B), determinados mediante Western blot y en condiciones no reductoras. Las flechas, asterisco y recuadro indican bandas importantes para la caracterización. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

En condiciones reductoras, las diferencias antigénicas entre los siete aislados son menos evidentes que en condiciones reductoras, debido a la gran cantidad de bandas que aparecen en los Western blot. El suero anti-B1 reconoce una banda de 52kD en todas las muestras (flecha en la Fig. 30A), mientras que el suero anti-D2 no reconoce bien esa banda en el aislado D3 (Fig. 30C) y el anti-D3 no reconoce esa banda en ninguna de las muestras (Fig. 30D).

El suero anti-C1 reconoce una banda de 37 kDa (flecha en la Fig. 30B) en las muestras de los aislados D2, P1 y S1.

También existen diferencias de reconocimiento antigénico entre los aislados en la zona localizada entre los 40-47 kDa (recuadro en la Fig. 30A).

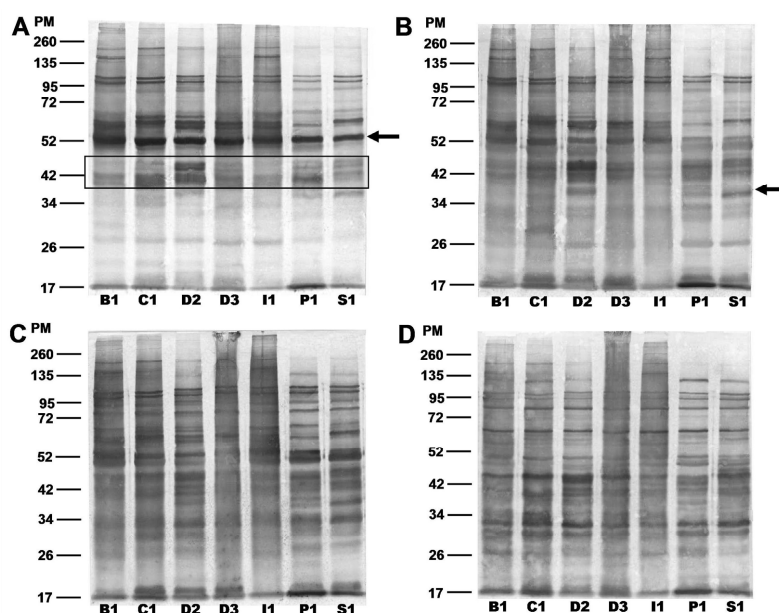


Figura 30. Patrones de reconocimiento antigénico en las muestras de membrana de los aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente al antígeno de membrana de los aislados B1 (A), C1 (B) D2 (C) y D3 (D), determinados mediante Western blot bajo condiciones reductoras. Las flechas y recuadro indican bandas importantes para la caracterización. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

Debido al bajo reconocimiento antigénico obtenido con los sueros anti-aislado de rodaballo, para el análisis de los patrones serológicos de los antígenos de membrana se han utilizado sueros de rodaballo generados a partir de la inmunización con antígenos de membrana (Fig. 31). De todas formas, es evidente que estos sueros poseen un reconocimiento antigénico más limitado que el obtenido con los sueros de ratón. Todas las muestras presentan dos bandas de 32 y 34 kDa, marcadas fuertemente por los sueros anti-membrana B1, C1, D2 e I1. Sin embargo, el suero preinmune de rodaballo reconoce mayoritariamente la banda de 34 kDa (asterisco en Fig. 31H), y también marca, aunque de forma más tenue, dos bandas finas de 64 kDa y 84 kDa (siluetas de flecha en la Fig. 31H).

El reconocimiento de los 7 sueros ante los diferentes antígenos es muy similar, y las mayores diferencias parece que se encuentran en la zona entre los 64-50 kDa (recuadros en la Fig. 31A). Las muestras de los aislados B1, C1, D2, D3 e I1 contienen una banda de 52 kDa (flechas en la Fig. 31) reconocida en mayor o menor medida por todos los sueros, y las muestras de los aislados D3 e I1 poseen una banda de 50 kDa; sin embargo, el antígeno del aislado P1 muestra de forma tenue la banda de 50 kDa, y muestra además una banda (asterisco en la Fig. 31B) entre las dos bandas de 50 y 52 kDa, que no está presente en ninguno de los antígenos de los otros aislados.

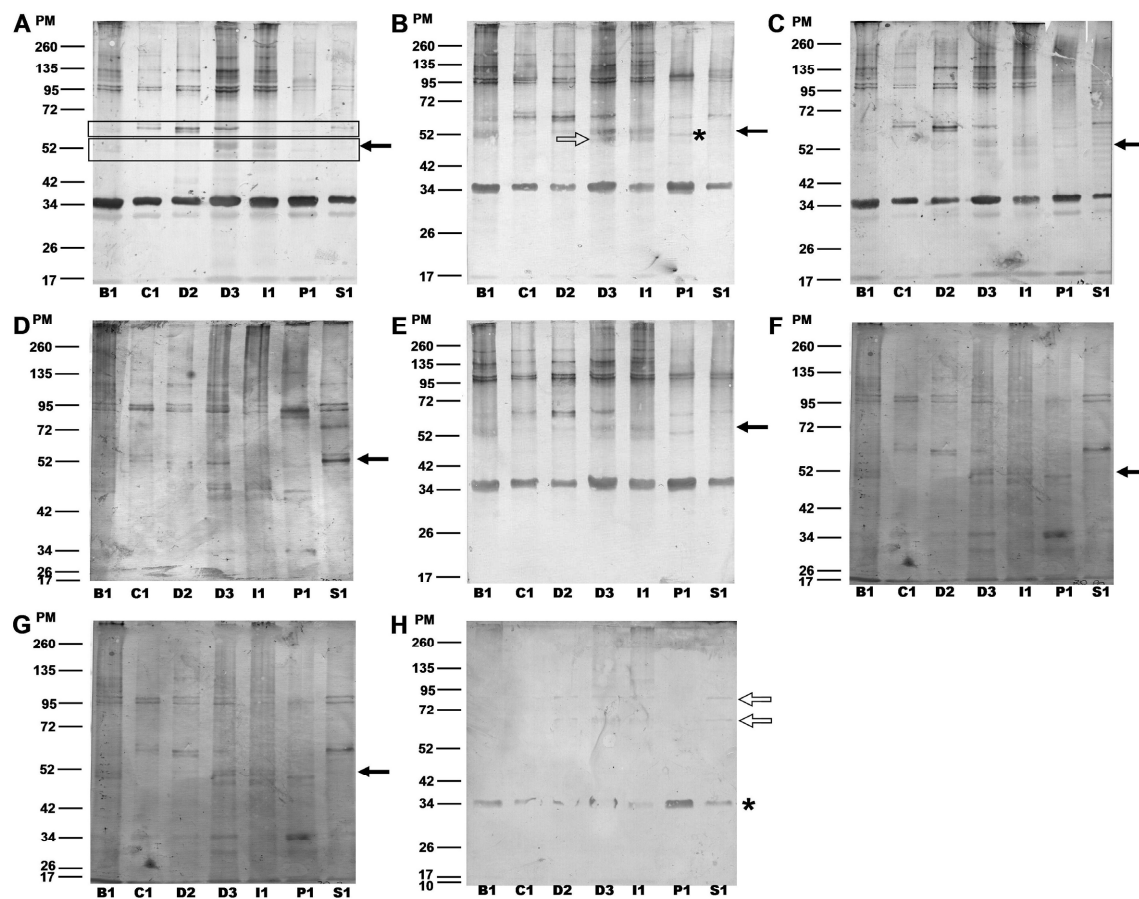


Figura 31. Patrones de reconocimiento antigénico de las muestras de membrana de los aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de rodaballos inmunizados frente al antígeno de membrana de los aislados B1 (A), C1 (B), D2 (C), D3 (D), I1 (E), P1 (F) y S1 (G), y por el suero preinmune de rodaballo (H), determinados mediante Western blot bajo condiciones no reductoras. Las flechas, asteriscos y recuadros indican bandas importantes para la caracterización. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

3.2. ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN CRUZADA ENTRE LOS AISLADOS DE *P. dicentrarchi*

En las instalaciones del Clúster de la Acuicultura de Galicia, realizamos un ensayo de vacunación con algunas combinaciones vacuna/reto usando 6 de los aislados, con el fin de establecer la protección cruzada inducida por cada aislado. Para este ensayo, se vacunaron 10 grupos de peces a los días 0 y 30 con vacunas que contenían ciliados de los aislados B1 (2 grupos), D2 (3 grupos), D3 (2 grupos) e I1 (3 grupos). Al día 60 post-vacunación, se realizaron retos utilizando los aislados B1 (3 grupos), C1 (2 grupos), I1 (2 grupos) y D3 (3 grupos). Para el diseño del experimento utilizamos el programa Statgraphics plus 5.1.

Antes de la infección experimental, se extrajo sangre de 5 rodaballos de cada grupo para comprobar la efectividad de la vacunación en cuanto a la producción de anticuerpos frente a los aislados utilizados. A la vista de los resultados del ELISA, se observa que, si bien existe una significativa producción de anticuerpos en los grupos de rodaballos, también existen diferencias relevantes en la producción de anticuerpos entre los rodaballos (Fig. 32).

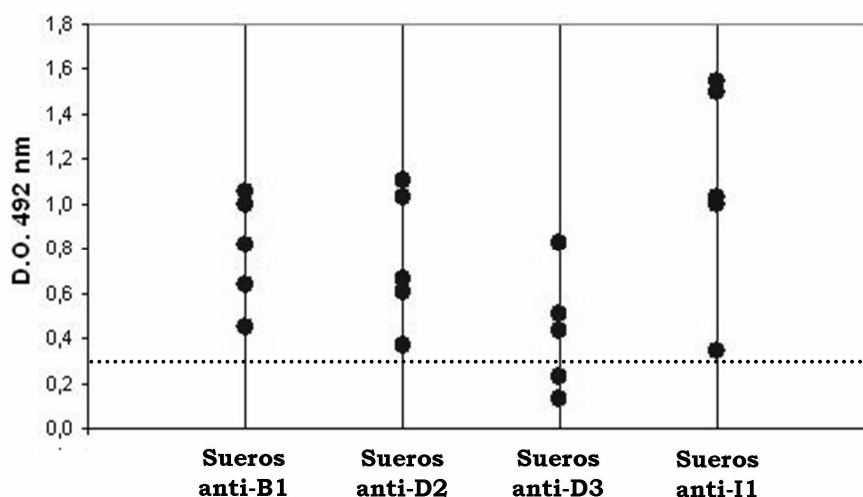


Figura 32. Niveles de anticuerpos, determinados por ELISA, generados por los sueros de rodaballos vacunados con ciliados de los aislados B1, D2, D3 e I1, frente a los extractos totales del aislado homólogo. La línea de puntos representa la media de 5 sueros preinmunes. Los resultados se expresan como unidades de absorbancia a 492 nm (n=5).

Los resultados de este experimento, una vez analizados estadísticamente, indican que en algún caso no existe protección cruzada (como es el caso de I1 y D2, ya que I1 mata al 100% de los peces vacunados con D2 frente al 50% de los peces vacunados con I1) mientras que entre el resto de los aislados, la protección es parcial y varía dependiendo de la pareja de aislados utilizados para la vacunación y el reto (Fig. 33). Al realizar el reto con B1, observamos que la vacunación con el aislado homólogo ofrece más protección (44% de mortalidad) que la vacunación con el aislado D3 (54% de mortalidad) o con el aislado I1 (67% de mortalidad). De igual forma, al realizar el reto con el aislado D3, observamos que la vacunación con este mismo aislado ofrece más protección (15% de mortalidad) que la vacunación con los aislados I1 (31% de mortalidad) o D2 (74% de mortalidad). Por otro lado, los aislados B1 y D2 inducen una protección similar frente al C1. Estos resultados nos permiten establecer una cierta relación entre aislados, asumiendo que los que inducen una mayor protección cruzada son los más parecidos. Por ejemplo, basándonos en el porcentaje de mortalidad obtenido, el aislado D3 sería más parecido al I1 que al D2, y el aislado B1 sería más parecido al D3 que al I1, y así con los otros aislados.

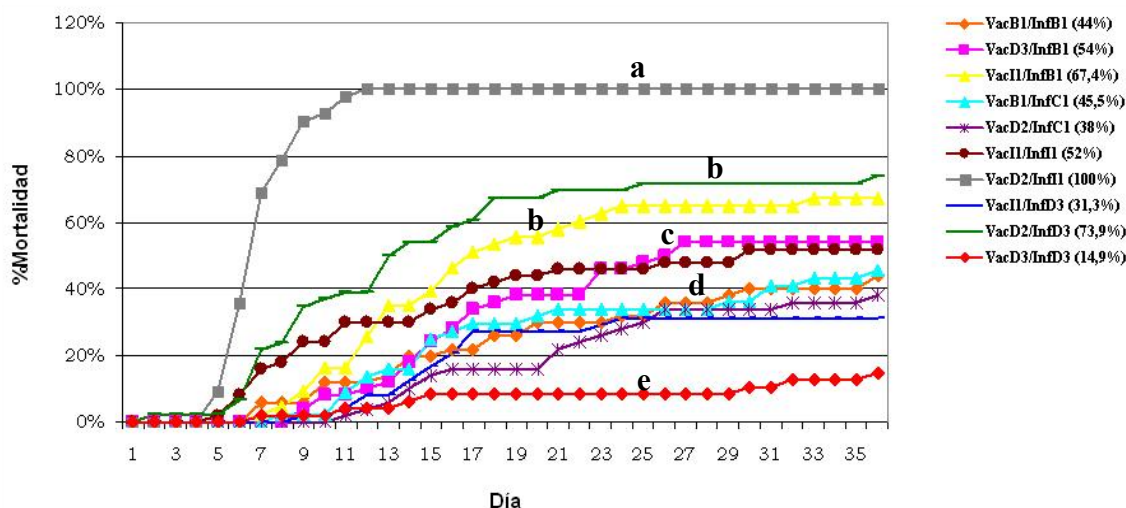


Figura 33. Mortalidad acumulada obtenida a partir del reto experimental en rodaballo. Los peces fueron vacunados (Vac) con los aislados B1, D2, D3 o I1. Pasado un mes tras la segunda vacunación, los peces se retaron (Inf) con los aislados B1, C1, D3 o I1 (5×10^5 parásitos/pez). Se muestran los porcentajes de mortalidad acumulada pasados 38 días desde el reto. Los grupos indicados por diferentes letras (a-b-c-d-e) difieren significativamente ($P < 0,05$).

3.3. ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LOS ANTÍGENOS DE LOS AISLADOS DE *P. dicentrarchi*

La reactividad cruzada entre los siete aislados se analizó mediante un ELISA indirecto de los antígenos de membrana frente a los sueros anti-aislado obtenidos en ratón (Fig. 34). Todos los sueros ponen de manifiesto la alta producción de anticuerpos generada en los ratones tras la vacunación, y se observa que para todos los sueros existe una elevada reactividad cruzada frente a los siete antígenos, que en ningún caso es superior frente al antígeno homólogo (Fig. 34).

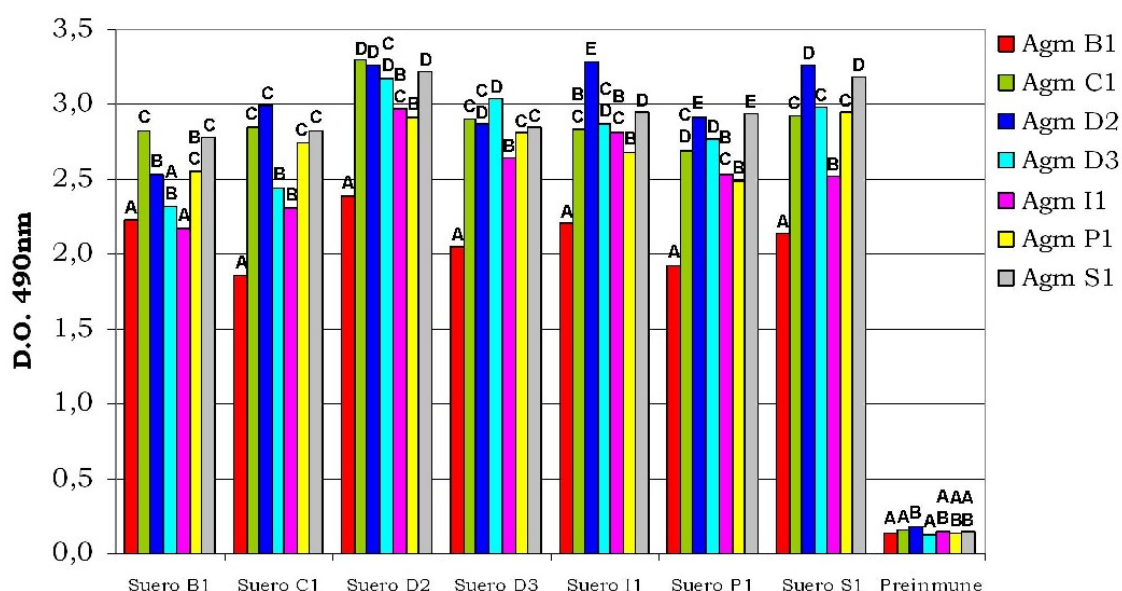


Figura 34. Niveles de anticuerpos, determinados por ELISA, generados por sueros de ratones vacunados con ciliados de uno de los siete aislados de *P. dicentrarchi*, frente a los antígenos de membrana de los siete aislados. En el ELISA se incluyeron también sueros preinmunes de ratón. Los resultados se expresan como unidades de absorbancia a 490 nm y los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar de sueros de 5 ratones. Los grupos indicados por diferentes letras (A-B-C-D-E) difieren significativamente ($P < 0,05$) dentro de cada uno de los sueros sobre el eje X.

La producción de anticuerpos tras la vacunación de los rodaballos es bastante inferior a la conseguida en ratones y los resultados obtenidos en cuanto a reactividad cruzada y reactividad frente al antígeno homólogo son similares a los obtenidos en el ELISA ensayando los sueros de ratón. De los siete antígenos, los que generaron una mayor respuesta fueron los correspondientes a los aislados C1 y D2, mientras que la respuesta ante el antígeno del aislado I1 fue la menor para los siete sueros (Fig. 35).

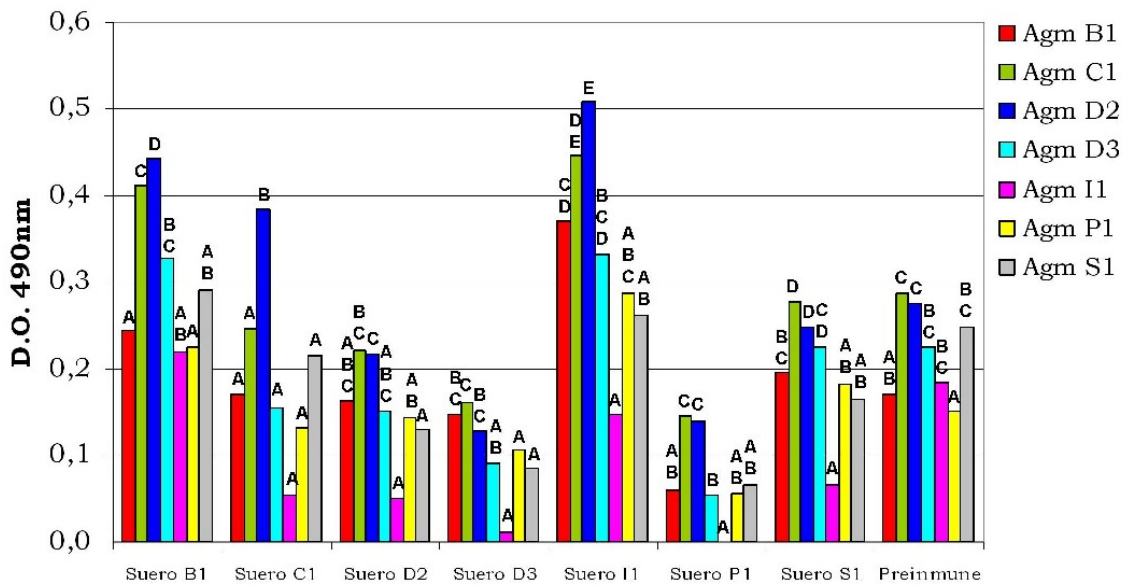


Figura 35. Niveles de anticuerpos, determinados por ELISA, generados por sueros de rodaballos vacunados con ciliados de uno de los siete aislados de *P. dicentrarchi*, frente a los antígenos de membrana de los siete aislados. En el ELISA se incluyeron también sueros preinmunes de rodaballo. Los resultados se expresan como unidades de absorbancia a 490 nm y los valores mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar de sueros de 5 rodaballos. Los grupos indicados por diferentes letras (A-B-C-D-E) difieren significativamente ($P < 0,05$) dentro de cada uno de los sueros sobre el eje X.

DISCUSIÓN

La inmunización con ciliados fijados con formalina y adyuvante ha proporcionado resultados satisfactorios en la protección en varias especies de peces: los rodaballos vacunados con una vacuna que contiene un aislado de *P. dicentrarchi* adquieren un alto grado de protección frente a ese aislado (Lamas *et al.*, 2008; Sanmartín *et al.*, 2008) y los lenguados japoneses inmunizados con *M. avidus* fijados con formalina mostraron bajas mortalidades en infecciones experimentales con el ciliado (Jung *et al.*, 2006).

En los resultados obtenidos tras un ensayo de protección realizado con los aislados C1 e I1 de *P. dicentrarchi*, se observa que ninguna de estas dos cepas protege frente a la otra (Piazzon, 2010). Si bien no tenemos todas las combinaciones de vacunación/infección, se observa que ciertos aislados pueden agruparse en base a la protección, asumiendo que aquellos aislados que ofrecen una mayor protección cruzada son más parecidos entre sí. Con los resultados obtenidos en este trabajo, además de los obtenidos en trabajos anteriores (Piazzon, 2010), y extrapolando los datos que faltan a partir de ellos,

encontramos que el aislado D3 no protege frente a B1, y que el aislado I1 no protege frente a C1 (protección que tampoco sucede en sentido inverso) o B1 (aislados que presentan protección cruzada entre ellos), aunque sí protege frente a D3; el aislado D2 no protege frente a los aislados I1 y D3, y protege en cambio frente al aislado C1, por lo que podríamos esperar que proteja también frente a B1. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de dos grupos entre los que no existe protección cruzada, y dentro de los cuales los aislados se protegen entre sí, aunque en algunos casos la protección sea parcial: uno estaría formado por los aislados B1, C1 y D2, y el otro incluiría los aislados I1 y D3.

Los Western blot realizados con las muestras de membrana o de ciliado entero indican que los aislados de *P. dicentrarchi* poseen un patrón polipeptídico diferente, algo ya observado en trabajos anteriores realizados por nuestro grupo (Piazzon *et al.*, 2008) y en trabajos realizados con *M. avidus* en el lenguado japonés (Song *et al.*, 2009b), avalando así la existencia de distintos serotipos dentro de esta especie. Al igual que se ha encontrado en otros trabajos, se observa que los antisueros de rodaballo muestran una limitada capacidad de discriminación antigénica, mucho menor que la de los antisueros de ratón (Leiro *et al.*, 1994; Piazzon *et al.*, 2008).

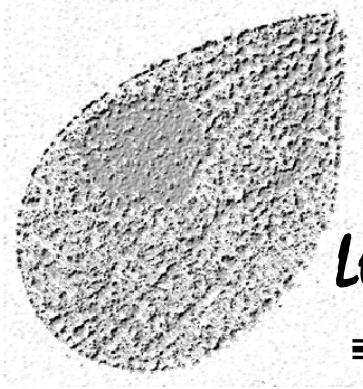
A la vista de los Western blot realizados con los distintos aislados, observamos que es común la presencia de bandas específicas de cada aislado, a menudo sólo reconocidas por el antisuero homólogo. Estas bandas no parecen ser importantes en la protección ya que, a pesar de su presencia, existe protección cruzada entre algunos aislados que no las comparten. Si tenemos en cuenta el reconocimiento antigénico global de los sueros frente a los siete aislados, se observan muchas similitudes entre el patrón de reconocimiento de los aislados B1, C1 y D2, y entre el patrón de reconocimiento de los aislados D3, I1, P1 y S1. En el antígeno de membrana no reductor, los sueros de ratón anti-D3, anti-I1, anti-P1 y anti-S1 reconocen un grupo de bandas en la zona de 26-42 kDa en sus antígenos homólogos, que no aparecen en cambio en los antígenos

de los aislados B1, C1 y D2, ni son reconocidas por sus sueros homólogos en los aislados restantes. Estas bandas nos separan a los aislados en dos serotipos coincidentes con los grupos de protección. Es necesario, en cualquier caso, determinar en posteriores investigaciones cuales de estos antígenos inducen protección frente al ciliado.

En un ensayo realizado con aislados de *M. avidus* de lenguado japonés, Song et al. (2009b) encontraron que las mayores diferencias antigénicas correspondían a la zona de bandas entre los 30 y 40 kDa y distinguieron tres serotipos en esta especie, asociados a tres polipéptidos mayoritarios, de 30, 34 y 38 kDa; los datos combinados de los ensayos de inmovilización y del Western blott sugirieron que estos polipéptidos de 38 kDa y 34 kDa no están relacionados con el epitopo de inmovilización. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que el reconocimiento de la banda de 34 kDa, presente en todos los aislados, por el suero preinmune de rodaballo, sugiere que esta banda podría ser inespecífica. Por otra parte, en estudios previos se observó que el polipéptido principal en los antígenos que contenían la fracción ciliar y membranosa de *P. dicentrarchi* resultó ser un polipéptido de 38 kDa, reconocido por todos los sueros de ratón con capacidad aglutinante analizados, y la predominancia cuantitativa de esta proteína en los diferentes componentes ciliares y en la membrana del parásito sugiere que podría ser el i-antígeno de *P. dicentrarchi* (Iglesias et al., 2003a).

Los resultados del Western blot avalan la asignación de los aislados a los dos serotipos anteriormente mencionados y coinciden con lo encontrado en protección. Basándonos en estos resultados, sería lógico pensar que los dos aislados de los que no poseemos datos de protección (P1 y S1) se asignarían, en base a sus patrones polipeptídicos, al mismo grupo que incluye a los aislados I1 y D3.

El ELISA de los sueros de rodaballos y ratones vacunados frente a los diferentes aislados mostró en ambos casos una elevada reactividad cruzada, y sería lógico pensar que ésta se debe a que todos los serotipos comparten un amplio grupo de antígenos que, si bien son reconocidos por el suero, podrían no estar participando en la protección. La inespecificidad de esta técnica en ese sentido la hace poco útil para ser utilizada en la discriminación de los serotipos de este ciliado.



Capítulo 4
**ANÁLISIS ECOFISIOLÓGICO DE
LOS AISLADOS DE *P. dicentrarchi***

Se cree que los aislados clonales de una sola morfoespecie procedente de diversas localizaciones de todo el mundo retienen características fisiológicas que reflejan la naturaleza del hábitat en el cual fueron tomadas (Finlay, 2004). La tasa de crecimiento máxima potencial, por tanto, podría depender de las condiciones del hábitat donde las especies fueron obtenidas (Parker, 1976; Gilron y Lynn, 1989; Wickham y Lynn, 1990; Pérez-Uz, 1995). Por otro lado, la variabilidad intraespecífica individual debida a la alimentación de protistas es más grande en el medio natural que bajo condiciones estandarizadas de laboratorio (Weisse, 2002), por lo que es de esperar que las diferencias obtenidas en los ensayos *in vitro* sean realmente menores que en el medio natural.

Seed (1978) encontró una variación máxima de sólo un 10% de varianza en las tasas de crecimiento de clones de tripanosomas aislados de la misma infección, y ninguna de estas diferencias mostró correlación con el antígeno de superficie expresado. Clones de otros parásitos como *Uronema* y *Meseres corlissi* muestran también diferencias en su tasa de crecimiento y respuesta ante la temperatura, salinidad, etc. (Pérez-Uz, 1995; Weisse *et al.*, 2007; Gätcher y Weisse, 2006).

En cuanto al tratamiento de la escuticociliatosis, la localización endógena de *P. dicentrarchi* dificulta el tratamiento de la escuticociliatosis en peces infectados. Actualmente, la forma más eficaz de luchar contra este ciliado consiste en la vacunación (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008; Sanmartín *et al.*, 2008), siempre teniendo en cuenta la existencia de diferentes serotipos dentro de la especie, entre los cuales no existe protección cruzada (Piazzon *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2009b). Otra posible forma de combatir a este parásito es el uso de compuestos químicos para controlar las formas libres del ciliado, reduciendo de esta forma la presión infectiva sobre los peces. En estudios previos, se ha evaluado la eficacia *in vitro* e *in vivo* de varios compuestos frente a *P. dicentrarchi* y otros escuticociliados (Iglesias *et al.*, 2002; Harikrishnan *et al.*, 2010).

Compuestos como la formalina, comúnmente utilizada para tratar infecciones ectoparasitarias, son efectivos para la eliminación de formas libres de *P. dicentrarchi* (Iglesias *et al.*, 2002). Sin embargo, la formalina puede afectar adversamente a los organismos acuáticos incluyendo algas, insectos y otros invertebrados (Boyd, 1990), y puede causar daño a las branquias, ojos e hígado, así como anemia e hipoglucemia en algunos peces (Wedemeyer 1971; Cruz y Pitogo 1989; Omoregie *et al.*, 1994). El peróxido de hidrógeno, un potente agente oxidante con un uso potencial como compuesto terapéutico en peces (Rach *et al.*, 2000; Buchmann y Kristensson, 2003; Buchmann *et al.*, 2003), es también efectivo frente a algunos escuticociliados (Harikrishnan *et al.*, 2010). El peróxido de hidrógeno se descompone rápidamente en H₂O y CO₂ y, por tanto, no se acumula o transforma en metabolitos tóxicos complejos (Heinecke y Buchman, 2009).

Si bien los compuestos mencionados disminuyen las cantidades de parásitos libres en el agua, no son respetuosos con el medio ambiente y varios están prohibidos para su uso en sistemas de acuicultura en varios países y es por ello que existe un interés creciente en el uso de productos naturales en acuicultura para tratar o prevenir infecciones. El resveratrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene; RESV) es una fitoalexina natural producida por algunas plantas en respuesta ante ataques de parásitos o bajo condiciones de estrés (Pirola y Fröjdö, 2008). Numerosos trabajos demuestran sus propiedades antibacterianas (Chan, 2002; Chatterjee *et al.*, 2005), antivirales (Docherty *et al.* 2006), y antiparasitarias (Leiro *et al.* 2004a,b; Kedzierski *et al.* 2007; Son *et al.* 2007). El RESV tiene efectos citotóxicos o citostáticos sobre el parásito *P. dicentrarchi* dependiendo de la composición del medio de cultivo y la disponibilidad de nutrientes (Lamas *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2009).

El objetivo de estos ensayos es comparar varios parámetros relacionados con el crecimiento de los distintos aislados de *P. dicentrarchi*, así como su susceptibilidad ante compuestos químicos como el RESV, la formalina y el peróxido de hidrógeno, realizando también una comparación de la actividad anti-ciliado *in vitro* de estos tres compuestos.

RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE LOS DIFERENTES AISLADOS

Para estudiar la existencia de diferencias en el crecimiento de los distintos aislados de *P. dicentrarchi*, éstos fueron cultivados en medio L-15 completo suplementado con 10% FBSi, a 21 °C, partiendo de cultivos en la fase exponencial temprana. Cada día se realizó un recuento del número de ciliados en todas las réplicas, determinando la tasa de división a partir de tinciones de plata y la tasa de conjugación. Además, durante los cuatro primeros días del ensayo se tomaron muestras para realizar un estudio por citometría de flujo.

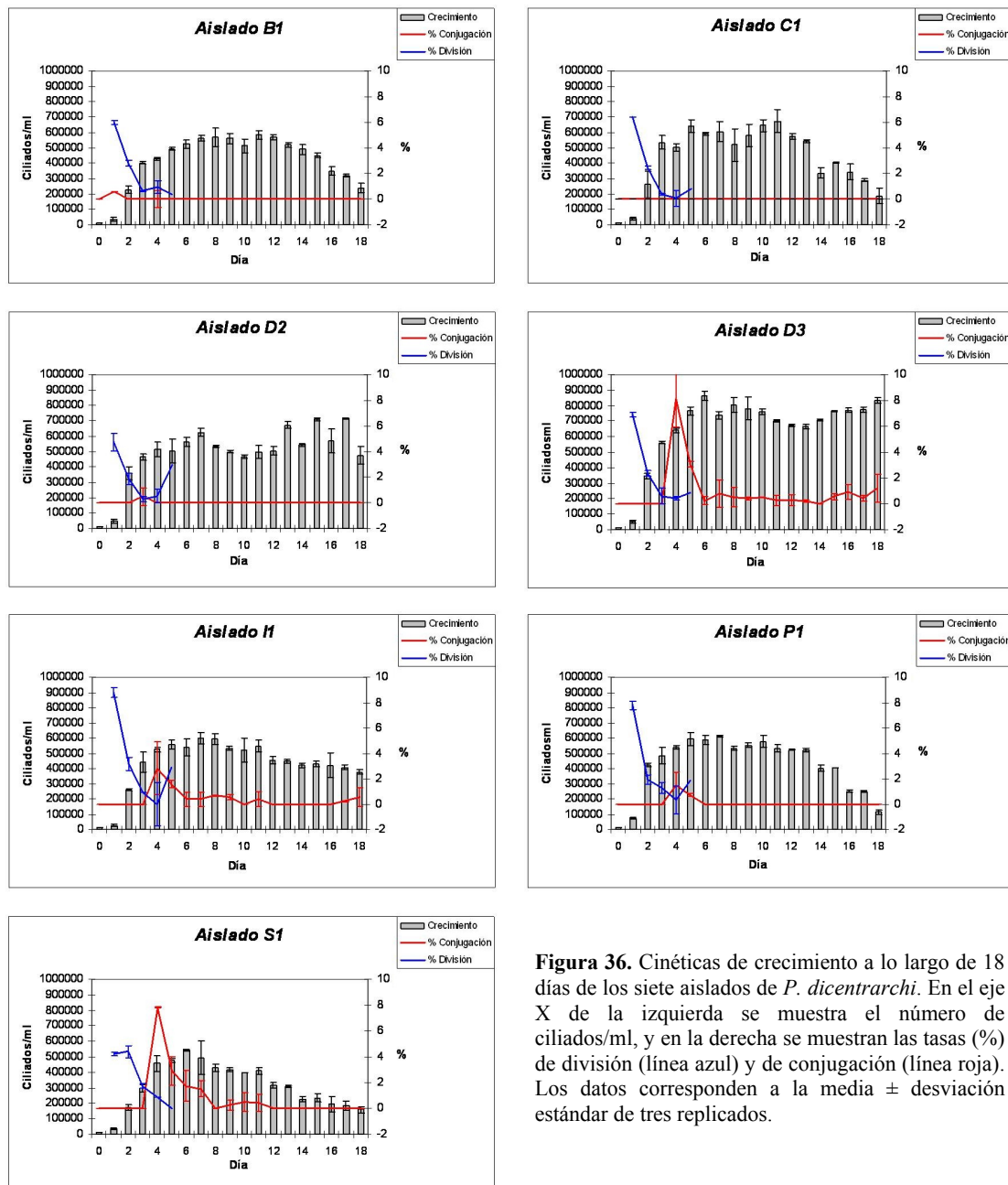


Figura 36. Cinéticas de crecimiento a lo largo de 18 días de los siete aislados de *P. dicentrarchi*. En el eje X de la izquierda se muestra el número de ciliados/ml, y en la derecha se muestran las tasas (%) de división (línea azul) y de conjugación (línea roja). Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de tres replicados.

A la vista de la figura 36, observamos que las cinéticas de crecimiento de todos los aislados presentan la misma tendencia general, con una fase exponencial de crecimiento que abarca hasta el día 5, seguida de una fase estacionaria y una posterior disminución de la población. Sin embargo, en los aislados C1, D2 y D3 se observa una fase con un pequeño aumento del crecimiento antes de la fase de declive.

Tras comprobar la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett ($p > 0,05$ en todos los casos, excepto para la conjugación, con una $p = 2,2 \times 10^{-16}$), se llevó a cabo un ANOVA de dos vías, con el aislado y el día como factores, para testar las diferencias en las variables de respuesta (crecimiento, tamaño,...). Cuando se observaron diferencias entre los valores medios de los diferentes niveles, se aplicó el test de comparación de diferencias honestamente significativas de Tukey-Kramer, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$ (Figura 37A). Se muestra además la representación gráfica de las medias de las diferentes variables (Figura 37B).

La mayor tasa de división coincide con el día 1 de cultivo para todos los aislados, excepto para el aislado S1, en el que se da al día 2 (Fig. 36). Si bien los aislados con una mayor tasa de división fueron I1, P1 y S1, el ANOVA mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos aislados (Fig. 37A,A').

Aunque los resultados del test de Bartlett para la tasa de conjugación impidieron la realización del ANOVA, encontramos tres grupos bien diferenciados en cuanto a su capacidad de conjugación: un grupo que comprende los aislados D3, S1 e I1, en los que la conjugación fue frecuente durante la revisión diaria de los cultivos, otro grupo que comprende los aislados B1, P1 y D2, en los que la tasa de conjugación fue muy baja, y un último grupo formado por el aislado C1, en el que no se observó conjugación en ningún momento durante la duración del ensayo (Fig. 36, 37E').

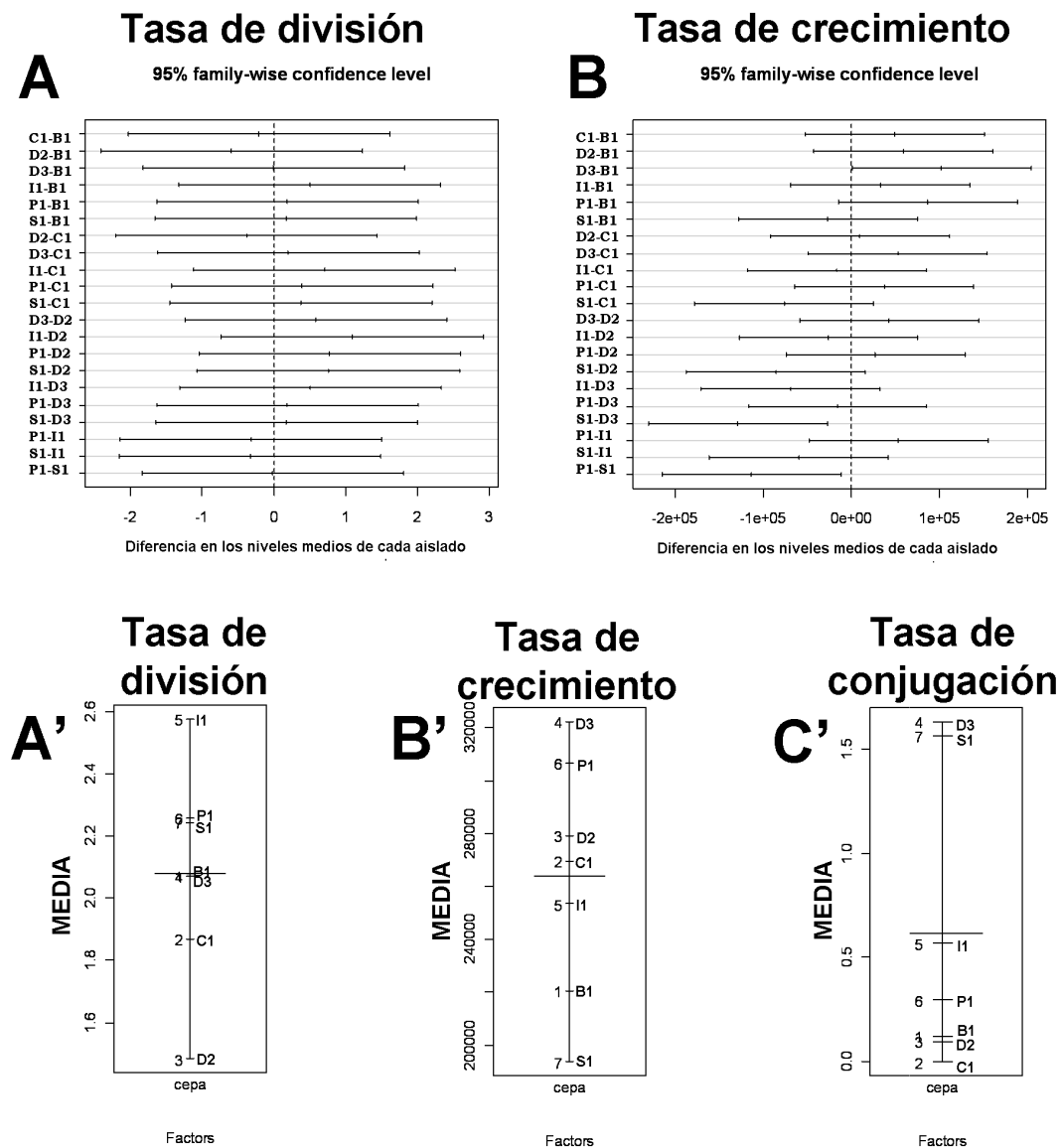


Figura 37. Representación gráfica de la comparación de los datos de tasa de crecimiento (A) y tasa de división (B), de los siete aislados de *P. dicentrarchi*, obtenida a partir de un ANOVA de dos vías con el aislado y el día como factores, seguido de un análisis Tukey HSD. Se muestra además la representación gráfica de las medias de estas variables, así como de la tasa de conjugación (A', B', C').

Con respecto a la tasa de crecimiento por día, el ANOVA sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en dos pares de aislados que implican al aislado S1, con la tasa de crecimiento más baja de entre los siete aislados, con los aislados D3 y P1, que son los de mayor tasa de crecimiento (Fig. 37B, B').

Con el fin de comparar las cinéticas de crecimiento de los aislados, los datos han sido sometidos a un modelo aditivo generalizado (GAM) ajustado a una distribución de Poisson (Fig. 38). El análisis estadístico de estos modelos de crecimiento muestra que cada aislado presenta una cinética de crecimiento característica y diferente a todas las demás.

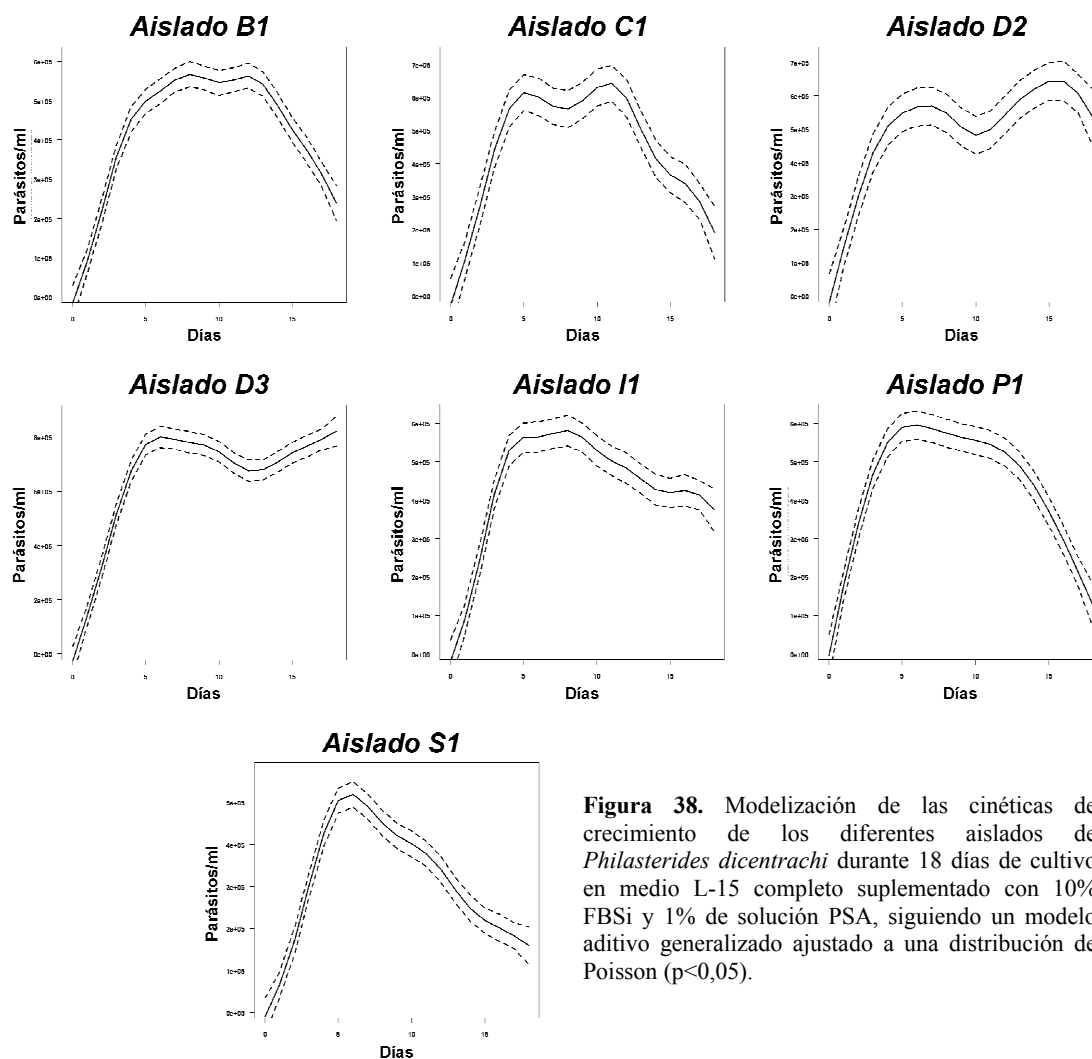


Figura 38. Modelización de las cinéticas de crecimiento de los diferentes aislados de *Philasterides dicentrarchi* durante 18 días de cultivo en medio L-15 completo suplementado con 10% FBSi y 1% de solución PSA, siguiendo un modelo aditivo generalizado ajustado a una distribución de Poisson ($p < 0,05$).

Además de evaluar el crecimiento, se estudió la evolución del tamaño y complejidad de los aislados mediante citometría de flujo (Fig. 39). A pesar de que se intentó partir de poblaciones homogéneas, la citometría de flujo nos indica que hay algunas diferencias en las poblaciones de ciliados a día 0, especialmente en el aislado I1 que muestra una población muy heterogénea en cuanto al tamaño con algunos ciliados muy pequeños. Desafortunadamente, el

análisis no nos ha permitido separar los ciliados en división del resto, debido seguramente a los ajustes del protocolo de adquisición, especialmente a los ajustes de ganancia del eje FSC.

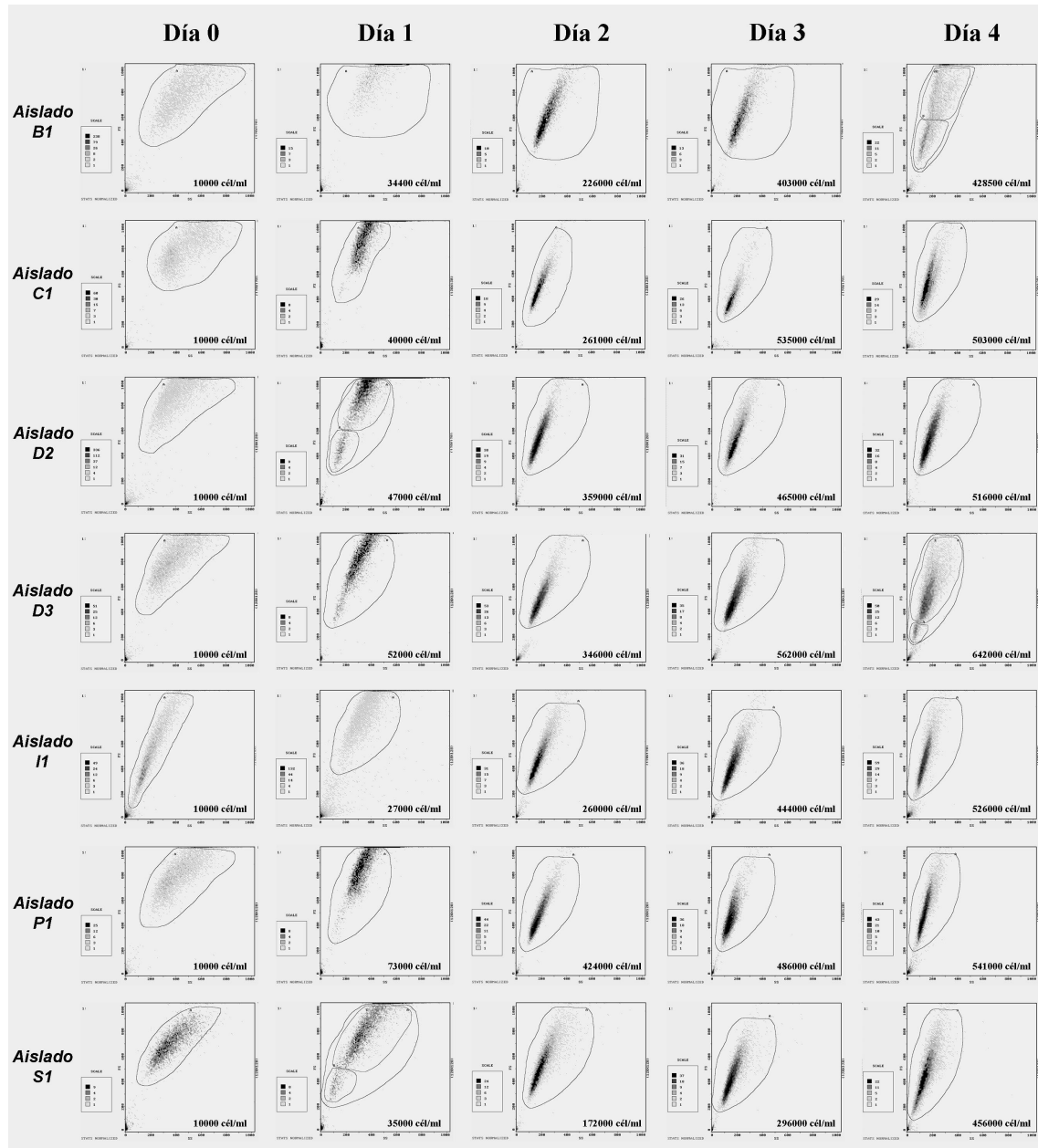


Figura 39. Análisis comparativo de citometría de flujo de los cambios en tamaño y complejidad celular a lo largo de 4 días de cultivo de los ciliados procedentes de los siete aislados de *P. dicentrarchi* cultivados en medio L-15 completo suplementado con 10% FBSi y solución PSA. La figura muestra los citogramas de dispersión (FSC, eje X, versus SSC, eje Y). Los resultados provienen de un experimento representativo, de los tres realizados.

En cualquier caso, sí es posible observar la evolución de los tamaños celulares, destacando la homogeneidad de los mismos a los días 2 y 3 en todos los aislados, incluso el aislado I1 que mostraba un patrón de tamaños diferente al resto a día 0. Las mayores diferencias en tamaño y complejidad se producen en los días 0 y 1, y son menos evidentes en los días 2 y 3 siguientes (Fig. 40A,B).

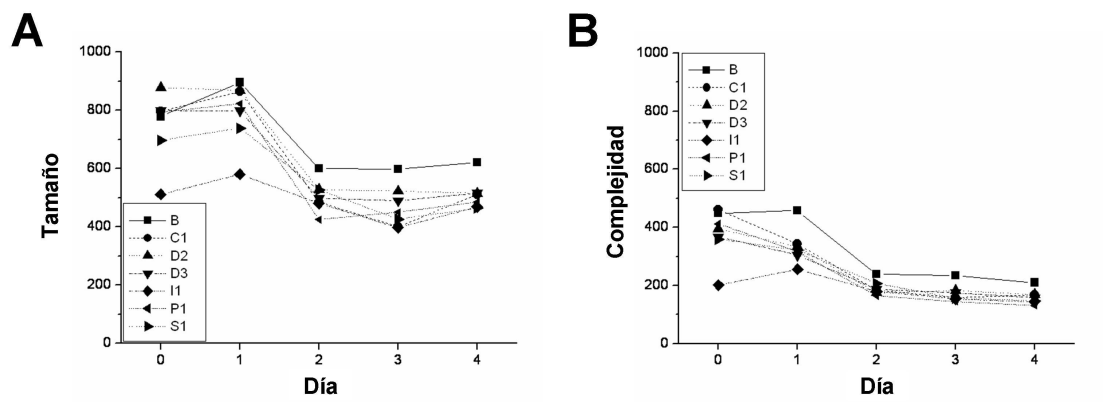


Figura 40. Cambios en tamaño (A) y complejidad (B), cuantificados mediante citometría de flujo, de los aislados de *P.dicentrarchi* cultivados en medio L-15 completo suplementado con FBSi durante 4 días.

Los datos de volumen celular y complejidad obtenidos del análisis de citometría se encuentran influenciados por la tasa de crecimiento, existiendo una correlación negativa entre estas dos variables y el número de células en el cultivo (Fig. 41). Por tanto, el volumen celular será mayor durante los primeros días de cultivo, debido en parte a una mayor tasa de crecimiento pero también a que los ciliados son más grandes por disponer de más nutrientes.

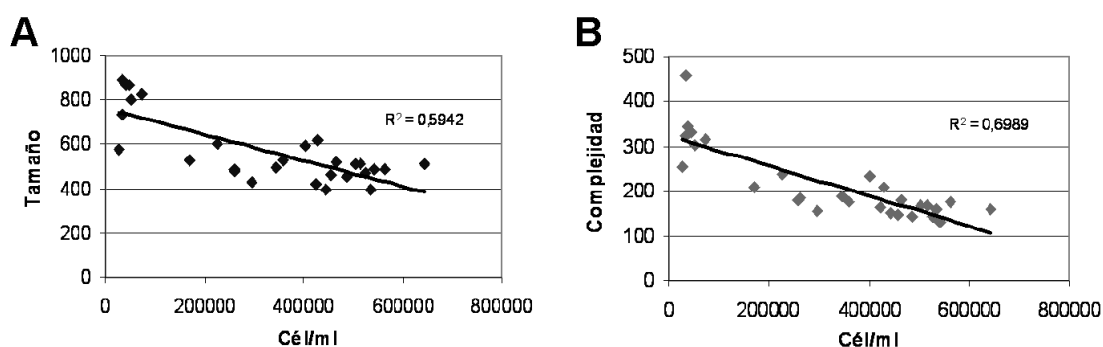


Figura 41. Correlación entre los valores de tamaño y complejidad, obtenidos a partir del estudio citométrico, y los valores de densidad de ciliados del cultivo, calculada mediante regresión lineal.

5.2. ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS COMPUESTOS QUÍMICOS

Previamente a la realización del ensayo, se realizó una prueba para comprobar la influencia del tipo de medio de cultivo en la eficacia de los quimioterápicos. Para esto, los parásitos se cultivaron en medio L15 completo con o sin FBSi, en medio L-15 incompleto y en agua de mar, con diferentes concentraciones de formalina y peróxido de hidrógeno. En el caso de la formalina (Fig. 42A), la LC100 es de 32,81 ppm en el caso del agua de mar, de 38,62 ppm en L15 completo con FBSi, y de 52,40 y 52,74 ppm en el caso del L-15 completo sin FBSi y L-15 incompleto, respectivamente. En el caso del peróxido de hidrógeno (Fig. 42B) es más evidente el efecto protector del L-15, ya que la LC100 es de 27,19 ppm en el caso del agua de mar, de 175,35 y 167,58 ppm en el caso del L-15 completo sin FBSi y L-15 incompleto, respectivamente, y de 233,64 ppm para el L-15 completo con FBSi.

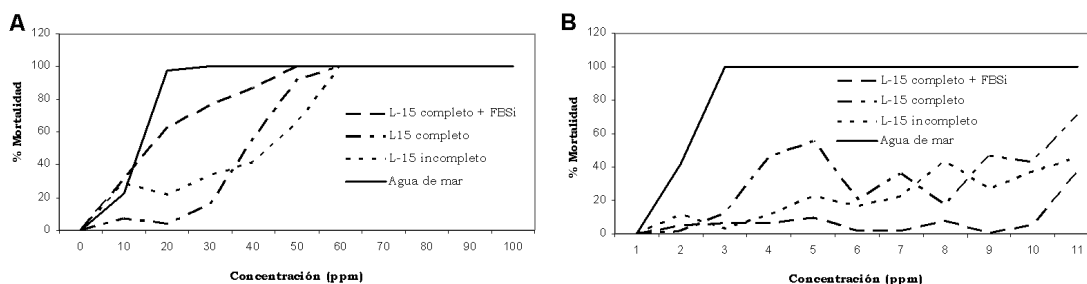


Figura 42. Porcentaje de mortalidad con respecto al control (%) obtenida tras 24 horas de cultivo en medio L-15 completo con o sin FBSi, medio L-15 incompleto y agua de mar, con distintas cantidades de formalina (A) y peróxido de hidrógeno (B). Cada punto representa la media de tres réplicas.

En vista de que el L-15 y el FBSi influyen en la eficacia de la formalina y el peróxido de hidrógeno, todos los ensayos que se muestran a continuación se realizaron en agua de mar.

Los tres compuestos testados resultaron tóxicos para los ciliados. La dosis más baja de formalina que indujo una mortalidad significativa con respecto al control fue de 5 ppm para los aislados I1, P1 y S1, de 10 ppm para el aislado C1 y de 15 ppm para los aislados B1, D2 y D3 (Tabla 9). Para el peróxido de hidrógeno, esta dosis fue de 5 ppm para los aislados B1, D3 y S1, de 10 ppm para los aislados C1, I1 y S1 y de 15 ppm para el aislado D2 (Tabla 9) y, con

respecto al RESV, fue de 5 ppm para el aislado S1, de 10 ppm para los aislados B1, D2 y P1, de 20 ppm para el aislado C1, de 25 ppm para el aislado D3 y de 50 ppm para el aislado I1 (Tabla 9).

La concentración de formalina que eliminó a todos los parásitos (MLD) fue de 25 ppm para los aislados P1 y S1 y de 30 ppm para los aislados B1, C1, D2, D3 y I1 (Tabla 9). La respuesta ante el peróxido de hidrógeno es más variable, y fue necesaria una concentración de 25 ppm para eliminar a todos los individuos de los aislados P1 y S1, 40 ppm para eliminar al I1, 50 ppm para eliminar al D3 y 70 ppm para eliminar al C1, mientras que los aislados B1 y D2 toleraron concentraciones de peróxido de hidrógeno por encima de 80 ppm (Tabla 9). La respuesta ante el RESV fue bastante similar, siendo la MLD de 60 ppm para el aislado D2 y de 70 ppm para los aislados restantes (Tabla 9).

Los tres compuestos provocan daños celulares en los ciliados, que son mayores a medida que aumenta la concentración, y que suelen conducir finalmente a la lisis celular (Fig. 43).

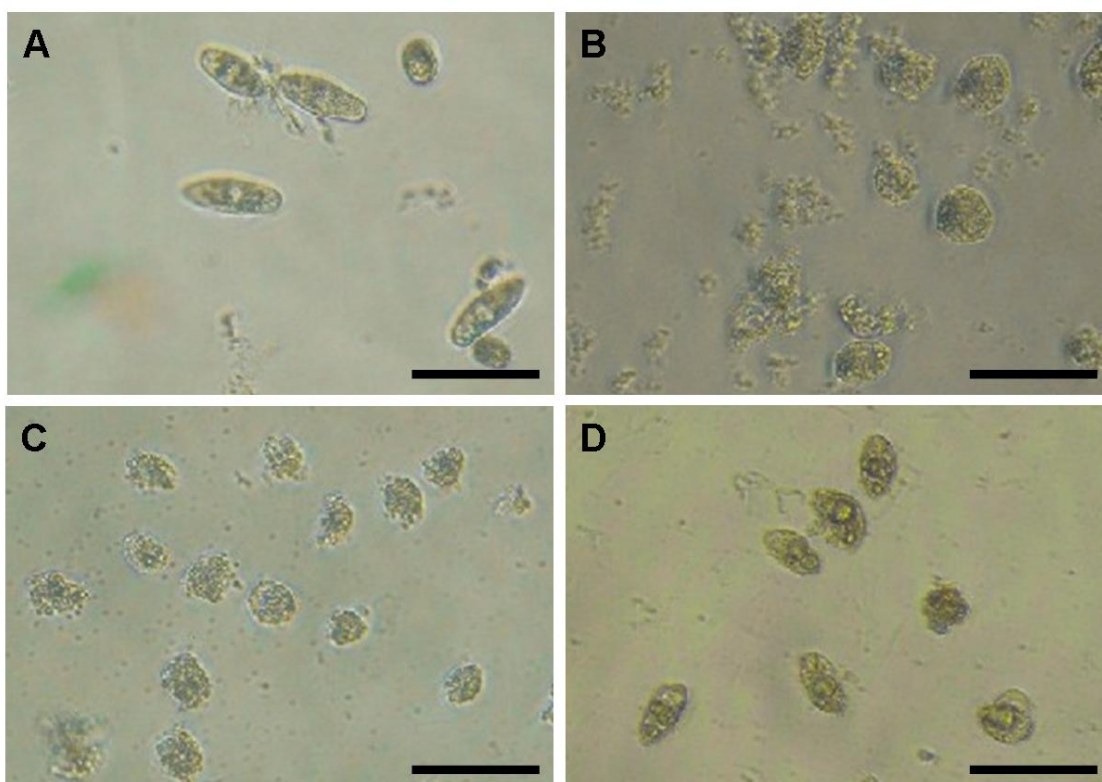


Figura 43. Efectos de la formalina, peróxido de hidrógeno y resveratrol sobre cultivos en agua de mar de *P. dicentrarchi*. Los cultivos fueron tratados durante 24 horas y los cambios morfológicos se determinaron al microscopio óptico. En las micrografías se muestra la morfología del aislado B1 sin ningún tratamiento (A), y los cambios morfológicos producidos por el tratamiento con 25 ppm de formalina sobre el aislado C1 (B), 33 ppm de peróxido de hidrógeno sobre el aislado D3 (C) y 25 ppm de resveratrol sobre el aislado P1 (D). Barra=10 μm.

Aislado	Día	0 ppm	5 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm	30 ppm	40 ppm	50 ppm	60 ppm	70 ppm	80 ppm
Formalina	B1	1	0 ± 3.94	11.4 ± 5.91	8.0 ± 9.02	14.8 ± 9.02	19.3 ± 5.21	83.0 ± 6.15	86.4 ± 3.41	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 5.81	9.2 ± 3.53	13.1 ± 1.33	39.2 ± 3.53	53.8 ± 4.00	57.7 ± 8.10	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	C1	1	0 ± 6.93	6.4 ± 5.50	25.7 ± 2.75	25.7 ± 7.28	41.3 ± 5.73	88.5 ± 1.59	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 9.66	7.1 ± 3.27	7.1 ± 7.53	11.4 ± 3.27	18.6 ± 4.29	65.0 ± 22.91	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	D2	1	0 ± 12.82	0 ± 13.48	13.7 ± 8.99	27.5 ± 4.49	89.7 ± 3.89	97.5 ± 0.85	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 13.01	19.7 ± 8.18	17.3 ± 4.72	48.8 ± 7.22	78.7 ± 2.36	96.9 ± 5.45	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	D3	1	0 ± 3.50	0.8 ± 3.50	1.5 ± 2.29	42.0 ± 1.32	51.1 ± 10.33	68.3 ± 3.68	99.6 ± 0.66	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 9.89	9.0 ± 5.77	12.7 ± 11.34	21.6 ± 13.24	40.7 ± 8.98	70.4 ± 8.66	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	II	1	0 ± 18.60	23.8 ± 4.76	19.0 ± 7.14	38.1 ± 4.76	54.0 ± 4.96	71 ± 4.81	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 10.21	3.4 ± 4.31	18.6 ± 1.19	37.9 ± 7.46	42.8 ± 3.16	62.1 ± 8.36	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	P1	1	0 ± 5.21	21.6 ± 17.05	27.3 ± 1.97	38.6 ± 5.91	93.8 ± 1.97	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 18.73	7.3 ± 4.20	22.9 ± 5.50	16.5 ± 10.42	85.3 ± 3.18	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
Peróxido de hidrógeno	S1	1	0 ± 10.90	35.0 ± 6.61	42.5 ± 5.00	58.3 ± 3.82	88.8 ± 3.31	98.3 ± 1.44	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 11.15	17.9 ± 11.15	6.3 ± 20.92	13.4 ± 6.74	75.9 ± 3.64	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	B1	1	0 ± 3.70	17.3 ± 5.66	33.3 ± 14.81	49.4 ± 4.28	92.6 ± 6.41	89.5 ± 2.14	97.5 ± 1.07	97.5 ± 2.83	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07
	3	0 ± 9.55	40.9 ± 4.09	51.2 ± 8.94	53.5 ± 9.55	70.9 ± 10.65	73.2 ± 7.59	83.5 ± 4.09	83.5 ± 10.30	88.2 ± 0.0	92.1 ± 9.83	97.2 ± 0.68	98.4 ± 0.68
	C1	1	0 ± 9.10	18.9 ± 15.59	25.5 ± 17.06	76.4 ± 9.94	96.2 ± 2.16	98.1 ± 0.82	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	100 ± 0.0
	3	0 ± 8.39	19.1 ± 2.61	23.5 ± 3.98	57.4 ± 7.53	62.6 ± 3.98	80.9 ± 3.99	90.4 ± 3.98	91.3 ± 1.51	99.1 ± 1.51	97.4 ± 4.52	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	D2	1	0 ± 1.57	20.0 ± 5.68	21.8 ± 8.77	37.3 ± 8.18	62.7 ± 18.16	79.5 ± 12.12	95.5 ± 2.08	94.1 ± 2.08	97.7 ± 0.79	98.6 ± 1.36	99.4 ± 1.07
	3	0 ± 12.91	25.8 ± 1.35	21.1 ± 3.58	27.3 ± 8.45	50.8 ± 4.69	72.7 ± 3.58	77.3 ± 10.57	83.6 ± 2.34	85.2 ± 3.58	93.8 ± 1.35	96.5 ± 2.03	98.4 ± 1.35
	D3	1	0 ± 3.53	19.2 ± 4.62	60.8 ± 2.31	95.4 ± 2.00	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 8.76	20.1 ± 6.40	62.7 ± 1.77	91.1 ± 1.78	99.4 ± 0.51	98.5 ± 1.36	99.7 ± 0.51	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	II	1	0 ± 2.13	8.5 ± 2.13	14.2 ± 8.86	91.8 ± 4.03	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 16.11	6.2 ± 11.58	8.9 ± 9.78	71.0 ± 8.20	93.5 ± 3.70	98.8 ± 2.05	99.7 ± 0.51	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
Resveratrol	P1	1	0 ± 6.86	2.7 ± 18.13	87.9 ± 6.86	99.4 ± 1.07	99.4 ± 1.07	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 12.82	11.1 ± 10.68	72.7 ± 6.45	87.6 ± 13.83	98.3 ± 1.96	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	S1	1	0 ± 10.26	41.0 ± 10.26	76.1 ± 9.00	99.6 ± 0.74	99.4 ± 1.07	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 7.69	7.7 ± 5.13	65.8 ± 9.00	95.7 ± 3.23	99.6 ± 0.74	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	B1	1	0 ± 5.68	13.5 ± 7.92	42.1 ± 4.70	42.1 ± 6.51	45.1 ± 3.45	44.4 ± 3.45	42.9 ± 5.68	47.4 ± 9.12	48.9 ± 9.39	99.2 ± 0.65	100 ± 0.0
	3	0 ± 3.36	1.0 ± 13.35	4.9 ± 13.13	6.8 ± 2.91	6.8 ± 11.65	40.8 ± 16.04	55.3 ± 4.45	82.0 ± 5.51	95.6 ± 4.37	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	C1	1	0 ± 6.06	2.9 ± 6.06	11.7 ± 4.45	18.4 ± 5.83	30.1 ± 11.65	41.7 ± 10.50	43.7 ± 10.23	65.0 ± 8.74	67.0 ± 6.06	73.8 ± 5.05	100 ± 0.0
	3	0 ± 8.33	32.7 ± 8.77	58.2 ± 5.68	60.0 ± 6.86	67.3 ± 5.45	69.1 ± 5.68	85.0 ± 3.61	86.8 ± 3.43	94.5 ± 1.36	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	D2	1	0 ± 11.11	5.6 ± 5.56	21.3 ± 5.78	37.0 ± 4.24	38.9 ± 2.78	45.4 ± 6.99	50.0 ± 5.56	53.7 ± 3.21	75.0 ± 10.02	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	3	0 ± 12.43	25.3 ± 13.94	36.8 ± 13.05	46.0 ± 7.18	54.0 ± 13.94	54.0 ± 8.68	56.3 ± 5.27	70.7 ± 9.60	97.7 ± 1.99	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	D3	1	0 ± 3.27	5.2 ± 2.40	8.4 ± 1.81	8.9 ± 8.75	12.0 ± 9.42	18.8 ± 3.63	19.9 ± 4.71	27.2 ± 9.47	48.7 ± 5.95	79.1 ± 3.54	100 ± 0.0
	3	0 ± 9.94	2.0 ± 3.15	14.1 ± 4.63	41.4 ± 6.83	63.6 ± 5.46	50.0 ± 6.94	51.0 ± 5.32	59.1 ± 10.61	82.6 ± 3.79	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	II	1	0 ± 10.60	5.5 ± 11.58	2.2 ± 14.87	2.2 ± 12.48	3.3 ± 8.30	22.5 ± 14.08	26.4 ± 6.86	25.3 ± 5.04	64.8 ± 10.07	99.4 ± 1.07	100 ± 0.0
	3	0 ± 9.76	3.9 ± 10.22	32.8 ± 1.35	34.4 ± 10.74	35.9 ± 7.16	46.1 ± 10.74	56.3 ± 4.88	79.7 ± 4.74	98.8 ± 2.03	99.6 ± 0.74	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	P1	1	0 ± 12.43	19.7 ± 10.11	22.9 ± 2.92	42.7 ± 6.89	42.7 ± 5.73	52.9 ± 8.62	55.4 ± 2.92	52.9 ± 4.41	59.2 ± 10.52	90.4 ± 6.62	100 ± 0.0
	3	0 ± 7.73	13.1 ± 3.57	18.9 ± 7.73	28.6 ± 5.51	37.1 ± 8.10	76.0 ± 6.86	78.9 ± 7.73	79.4 ± 1.71	96.3 ± 5.71	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	S1	1	0 ± 7.01	32.4 ± 4.59	35.3 ± 3.61	35.8 ± 5.20	54.9 ± 5.20	58.4 ± 6.25	63.6 ± 7.56	65.3 ± 3.47	69.4 ± 2.65	99.4 ± 1.00	100 ± 0.0
	3	0 ± 12.25	29.4 ± 5.19	34.0 ± 5.99	35.9 ± 2.26	43.8 ± 4.08	74.5 ± 7.07	77.8 ± 2.99	79.1 ± 4.08	92.2 ± 2.59	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0

Tabla 9. Porcentaje de mortalidad en relación al control (%), causada por las diferentes dosis de formalina (en ppm del producto comercial; 37% formalina), peróxido de hidrógeno (en ppm del producto comercial; 33% peróxido de hidrógeno) y resveratrol (en ppm del producto comercial) en varios aislados diferentes de *P. dicentrarchi* tras la exposición a los compuestos durante 24 horas en agua de mar. Los datos representan los valores de la media ± SD para tres réplicas. Los valores en negrita representan diferencias significativas en la mortalidad a días 1 y 3 con respecto al control ($p < 0.05$), y los valores indicados con asteriscos representan una recuperación significativa al día 3 con respecto al día 1 ($p < 0.05$).

Con los datos obtenidos de los recuentos de la mortalidad causada por los 3 compuestos, se realizó un modelo GAM de resistencia global de los siete aislados ajustados por tratamiento (Fig. 44). En las gráficas se observa una alta similitud en las curvas generadas por la formalina (Fig. 44A) y el peróxido de hidrógeno (Fig. 44B), aunque existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p < 0.000$); ambos compuestos, sin embargo, muestran una elevada diferencia con la curva generada por el RESV (Fig. 44C) ($p < 0.000$), que parece tener un efecto más lento que los otros dos compuestos. En la comparación de la resistencia global de las cepas pareadas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los pares que contenían las cepas P1 o S1 ($p < 0.000$), resultando además estas dos cepas diferentes entre sí ($p < 0.011$).

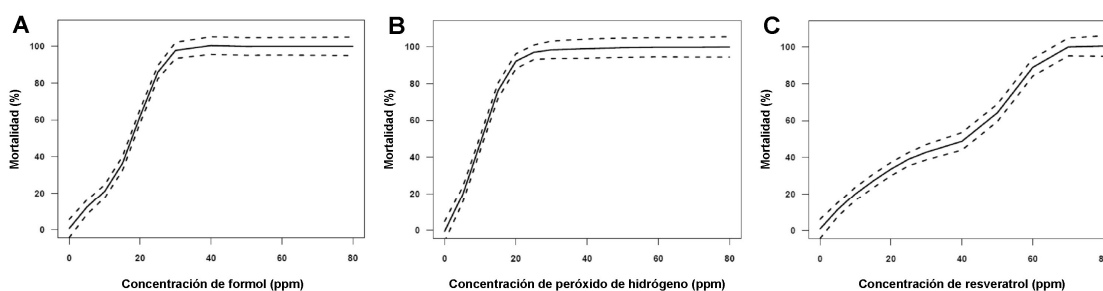


Figura 44. Resumen gráfico del ajuste del modelo GAM para la formalina (A), peróxido de hidrógeno (B) y resveratrol (C). La variable respuesta (mortalidad) se muestra en el eje Y y como una función centrada suavizada para asegurar una validez del 95% de las bandas de confianza. La covariable en el eje X representa la concentración en ppm del compuesto testado. Las curvas punteadas muestran las curvas de confianza del 95% alrededor del ajuste.

La toxicidad de los compuestos ensayados para los distintos aislados indica que la concentración que provoca el 50% de la mortalidad (LD50) varió desde 10,74 a 21,68 ppm para la formalina, desde 7,50 a 19,52 ppm para el peróxido de hidrógeno y desde 23,29 a 40,54 ppm para el RESV (Tabla 10). Se ha comparado la resistencia de los aislados a los tres compuestos químicos testados, y se han encontrado grandes variaciones en la LD50 entre los aislados, que fueron agrupados en al menos tres clases por el análisis Tukey-HSD (Tabla 10; superíndices), algunas de ellas con características intermedias entre clases.

	<i>B1</i>	<i>C1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>I1</i>	<i>P1</i>	<i>S1</i>
Formalina							
LD50	21,68 ± 0,02 ^C (21,64 – 21,72)	18,26 ± 0,02 ^{BC} (18,22 – 18,31)	18,53 ± 0,03 ^{ABC} (18,48 – 18,58)	20,14 ± 0,02 ^{BC} (20,09 – 20,18)	16,92 ± 0,02 ^{ABC} (16,88 – 16,96)	12,96 ± 0,03 ^{AB} (12,90 – 13,02)	10,74 ± 0,03 ^A (10,69 – 10,79)
Pendiente (β)	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02
Intercepto (α)	2,65	3,06	2,92	2,79	3,29	3,72	4,00
Peróxido de H							
LD50	15,11 ± 0,02 ^C (15,07 – 15,16)	12,20 ± 0,01 ^{BC} (12,18 – 12,23)	19,52 ± 0,03 ^D (19,46 – 19,58)	9,13 ± 0,01 ^{AB} (9,11 – 9,14)	11,08 ± 0,01 ^{ABC} (11,07 – 11,10)	8,44 ± 0,01 ^{AB} (8,41 – 8,46)	7,50 ± 0,01 ^A (7,47 – 7,52)
Pendiente (β)	0,12 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,34 ± 0,04	0,37 ± 0,04	0,38 ± 0,08	0,32 ± 0,04
Intercepto (α)	3,24	2,34	3,62	1,93	0,95	1,80	2,63
Resveratrol							
LD50	28,48 ± 0,03 ^{AB} (28,42 – 28,54)	33,82 ± 0,03 ^{BC} (33,76 – 33,87)	27,86 ± 0,03 ^{AB} (27,81 – 27,91)	40,54 ± 0,02 ^C (40,50 – 40,58)	37,18 ± 0,03 ^{BC} (37,12 – 37,24)	28,04 ± 0,03 ^{AB} (27,99 – 28,09)	23,29 ± 0,02 ^A (23,24 – 23,34)
Pendiente (β)	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Intercepto (α)	3,47	2,86	2,93	2,19	1,57	3,46	3,65

Tabla 10. Los valores mostrados corresponden a la LD50 para los tres compuestos testados (con la media ± SD y límites superiores e inferiores del intervalo de confianza del 95% entre paréntesis), pendiente (media ± SD) e intercepto las rectas de regresión del modelo Probit. Los superíndices ^{ABC} se refieren al grupo de asignación del análisis Tukey-HSD realizado.

DISCUSIÓN

Análisis del crecimiento de los aislados de *P. dicentrarchi*

P. dicentrarchi es un parásito con una elevada tasa de división, lo que le permite una rápida distribución por los distintos órganos y tejidos del hospedador. Hay que tener en cuenta que la variabilidad intraespecífica individual de los protistas es más grande en el medio natural que bajo condiciones de laboratorio estandarizadas (Weisse, 2002), ya que los cultivos de laboratorio mantenidos durante muchas generaciones optarán por un número reducido de cepas adaptadas (Weisse y Montagnes, 1998).

En la monitorización diaria de los cultivos de los siete aislados se observó, al ir disminuyendo el alimento, la aparición de formas pequeñas (tomites) en todos los frascos de cultivo, descrita también en *M. avidus* (Gómez-Saladín y Small, 1993a). Sin embargo, en otros ensayos realizados con estos mismos aislados utilizando *Uronema marinum* como presas no se observó nunca la transformación de microstoma a macrostoma inducida por predación descrita en *M. avidus* (Gómez-Saladín y Small, 1993b,c).

Se sabe que los clones de cultivos de ciliados usualmente revelan pronunciadas diferencias en parámetros ecofisiológicos como el volumen celular, tasa de crecimiento y producción (Pérez-Uz, 1995; Weiss, 2004). En cuanto a la tasa de crecimiento, en este estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el aislado con menor crecimiento (S1) y los

aislados con mayor crecimiento (D3 y P1). La tasa de crecimiento máxima potencial podría depender de las condiciones del hábitat donde las especies fueron recolectadas (Pérez-Uz, 1995; Wickham y Lynn, 1990), ya que los aislados clonales de una morfoespecie de diversas localizaciones pueden retener características fisiológicas que reflejan la naturaleza del hábitat en el cual fueron aisladas (Finlay, 2004; Weisse, 2006). En términos de competitividad, las cepas que crecen despacio pueden funcionar mejor que las que lo hacen rápido en un ambiente más constante con poca cantidad de nutrientes (Fenchel y Finlay, 1983).

La tasa de división no mostró diferencias significativas entre los siete aislados, aunque ésta resultó ligeramente superior en los aislados I1, P1 y S1. La tasa de conjugación, sin embargo, permite dividir a los siete aislados en tres grupos: un grupo con elevada tasa de conjugación formado por los aislados D3, S1, I1, otro grupo con tasa de conjugación baja formado por los aislados B1, D2 y P1, y un último grupo que comprende el aislado C1 en el que no se observó conjugación durante el estudio. La existencia de diferencias en la tasa de conjugación entre diferentes aislados de *P. dicentrarchi* (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004b) y entre cepas del escuticociliado *M. avidus* (Thompson y Moewus, 1964) ya había sido descrita previamente. Ya que la conjugación en ciliados puede ser inducida por la falta de alimento (Miyake, 1996; Sugiura y Harumoto, 2001) y la diversidad genética de los pares conjugantes (Doerder *et al.*, 1996), la diferente conjugación entre los aislados podría ser debida a su distinta sensibilidad ante el agotamiento de nutrientes o podría estar relacionada con una posiblemente distinta diversidad genética de los aislados (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004b).

La citometría de flujo ha sido aplicada para caracterizar células protistas por tamaño (Lindström *et al.*, 2002). En nuestro estudio se observaron diferencias en la evolución del tamaño y complejidad de los ciliados a lo largo de los 4 primeros días de cultivo. Tales diferencias pueden estar causadas por el diferente estado de los cultivos al inicio del ensayo (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004b), a pesar de haber sido todos ellos recolectados de cultivos frescos de dos

días, ya que su diferente tasa de crecimiento hace muy difícil la estandarización de las condiciones iniciales.

Una mayor tasa de crecimiento está asociada generalmente con un mayor volumen celular (Curds y Cockburn, 1971; Montagnes *et al.*, 1988), aunque parece que esto no se cumple en especies como *U. marinum* (Pérez-Uz, 1995). En este estudio se observa una cierta correlación positiva entre la tasa de crecimiento y el volumen celular obtenido de los datos citométricos, ya que los aislados D3 y P1, que resultaron ser los de mayor tasa de crecimiento, fueron además los de mayor tamaño celular. Sin embargo, los ciliados más grandes podrían corresponderse con los que se están dividiendo y de ahí la relación entre tamaño y crecimiento. Debido a las condiciones de adquisición del citómetro, no hemos podido separar los ciliados que se estaban dividiendo del resto, lo que no nos permite establecer una relación fiable entre tamaño y crecimiento. Una opción posible sería marcar el ADN para separar los que se están dividiendo del resto, en función de la cantidad de ADN por célula. Los datos del citómetro nos indican que las poblaciones presentan un mayor parecido a los días 2 y 3 de cultivo, y que ese es seguramente el mejor momento para comparar el tamaño entre los aislados. Además, la tasa de división es baja en estos días, por lo que las medidas que obtenemos del citómetro son más fiables.

Análisis de la susceptibilidad a los compuestos químicos de los aislados de *P. dicentrarchi*

La respuesta de los ciliados ante quimioterápicos como el RESV depende en gran medida del medio de cultivo en el que se realiza el ensayo y de la fase de crecimiento en la que se encuentren los ciliados (Morais *et al.*, 2009). Esto también se cumple en el caso de la formalina y el peróxido de hidrógeno, por lo que es conveniente evitar el uso de compuestos como el L-15 y el FBSi en la realización de los ensayos, ya que podrían falsear los resultados obtenidos.

Los tres compuestos testados resultaron tóxicos para los ciliados. Los regímenes de tratamiento efectivos para el control óptimo de los patógenos generalmente requieren del mantenimiento de una concentración mínima efectiva durante una longitud de tiempo específico, y regímenes por debajo o por encima de esta concentración podrían llevar a tratamientos inadecuados o incluso ser tóxicos para los peces (Rach *et al.*, 1997). Dada la elevada tasa de división del parásito, es importante alcanzar la dosis letal con el tratamiento, ya que la supervivencia de unos pocos parásitos conduce a la progresiva recuperación del cultivo. La recuperación tras la exposición a la formalina y el peróxido de hidrógeno fue mayor que tras la exposición al RESV, probablemente debido a que la formalina y particularmente el peróxido de hidrógeno se descomponen más rápido que el RESV.

La resistencia total de los parásitos a la formalina fue muy similar entre los distintos aislados (25 o 30 ppm, dependiendo del aislado). En un estudio reciente para determinar la eficacia *in vitro* de la formalina frente a *P. dicentrarchi* aislados de lenguado japonés, no se observó movimiento ciliar tras la exposición durante 150-180 minutos a 400 ppm de formalina (Harikrishnan *et al.*, 2010). Sin embargo, Iglesias *et al.* (2002) encontraron una MLD ante la formalina de 62 ppm en un aislado de *P. dicentrarchi* obtenido de rodaballo tras el tratamiento durante 24 horas. Las diferencias en las concentraciones de formalina necesarias para matar a los ciliados están relacionadas con el tiempo de exposición, y en exposiciones más cortas se requieren mayores concentraciones de formalina.

La resistencia al peróxido de hidrógeno varió mucho entre los aislados, y la MLD varió desde los 25 ppm hasta los 80 ppm, concentración que no es suficiente todavía para eliminar a los aislados B1 y D2. Estas MLD fueron más bajas que las descritas por Harikrishnan *et al.* (2010), pero, como ya se ha mencionado, tales diferencias podrían estar relacionadas con el tiempo de exposición. El motivo de las diferencias en la resistencia al peróxido de hidrógeno entre cepas no se conoce, aunque la variación intraespecífica entre ciliados acuáticos y otros protozoos es común (Weisse y Lettner, 2002). El

peróxido de hidrógeno puede ser descompuesto en hidrógeno y oxígeno por enzimas detoxificantes como la catalasa y las peroxidases, que están presentes en grandes cantidades en *P. dicentrarchi* (Lamas *et al.*, 2009) y estas diferencias en la resistencia al peróxido de hidrógeno podrían estar relacionadas con diferencias en la producción de estas enzimas por los ciliados. Estas diferencias en la resistencia deben ser tenidas en cuenta al utilizar este compuesto para controlar la cantidad de ciliados en el agua, con el fin de determinar si las cantidades mínimas que son ecológicamente aceptables son también suficientes para matar a los ciliados.

La resistencia total al RESV fue muy similar entre los aislados (60-70 ppm). Estos resultados sugieren que, a diferencia del peróxido de hidrógeno, el RESV afecta a las actividades celulares, que son similares entre todos los aislados. Como se ha encontrado previamente, las mitocondrias parecen ser el blanco principal del RESV en *P. dicentrarchi* (Lamas *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2009), y los efectos podrían ser probablemente similares en todos los aislados.

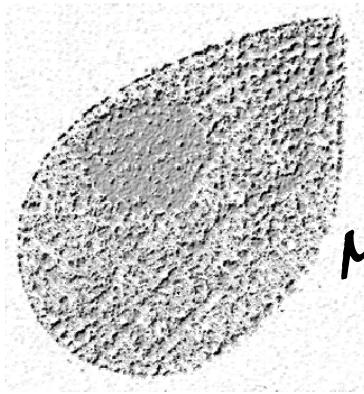
Los resultados obtenidos sugieren que la formalina y el peróxido de hidrógeno son más tóxicos que el RESV, aunque como ya se ha mencionado, algunos aislados parecen ser resistentes al peróxido de hidrógeno a las concentraciones utilizadas. Hemos aplicado un modelo aditivo generalizado (GAM) para mostrar la asociación entre los tratamientos y la mortalidad obtenida, y hemos encontrado una asociación positiva entre la concentración de los compuestos químicos utilizados y la mortalidad, así como que, aunque las toxicidades de la formalina y el peróxido de hidrógeno resultaron similares, en el caso del RESV deben utilizarse a concentraciones más altas para eliminar a todos los parásitos.

Se sabe que la formalina y el peróxido de hidrógeno son tóxicos para los peces (Avendaño *et al.* 2006; Keck y Blanc, 2002; Intorre *et al.*, 2007) y otros organismos vivos (Thrasher y Kilburn, 2001). Por lo que nosotros conocemos, el RESV no es tóxico para los peces a las concentraciones utilizadas en este estudio. Por el contrario, la esperanza de vida de alevines del pez *Nothobranchius furzeri* se incrementó después de que el pez fuera alimentado

con altas concentraciones de RESV (Valenzano *et al.*, 2006). La toxicidad del RESV para los mamíferos es también muy baja, incluso cuando el compuesto es administrado oralmente a concentraciones mucho mayores que las utilizadas en este estudio (Edwards *et al.*, 2011). El RESV es un producto natural producido por las plantas y por tanto podría ser una alternativa medioambientalmente aceptable a otros compuestos químicos para el tratamiento de la escuticociliatosis en peces.

Estudios previos han mostrado diferencias intraespecíficas en la resistencia de diferentes aislados de *Ichthyophthirius multifiliis* a los compuestos químicos (Straus *et al.*, 2009), probablemente debido a diferencias fisiológicas. En el presente estudio, se ha comparado la resistencia de los aislados a los tres compuestos químicos testados, y se han encontrado grandes variaciones en la LD50 entre los aislados, que fueron agrupados en al menos tres clases. Los aislados S1 y P1 mostraron la LD50 más bajas para los tres compuestos, pero en los otros aislados la LD50 resultó más variable, dependiendo del compuesto considerado; por ejemplo, el aislado D2 resultó muy resistente al peróxido de hidrógeno pero altamente susceptible al RESV.

La resistencia de los aislados ante la formalina y el RESV fue similar, pero la resistencia al peróxido de hidrógeno fue muy distinta entre los aislados (Tabla 3). Además, algunos individuos de ciertos aislados resultaron altamente resistentes al peróxido de hidrógeno, indicando una elevada variación en la resistencia dentro del mismo aislado. La resistencia a las especies reactivas de oxígeno (ROS) podría ser importante con respecto a la habilidad del ciliado para resistir el ataque del sistema inmunitario del pez, ya que los leucocitos estimulados del rodaballo producen grandes cantidades de ROS (Castro *et al.*, 1999).



Capítulo 5

APARICIÓN DE ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS EN *P. dicentrarchi*

Los escuticociliados, como la mayoría de ciliados, presentan reproducción sexual, definida por el fenómeno de la conjugación (Morado y Small, 1995; Cawthorn, 1997), y reproducción asexual mediante fisión binaria.

Todos los ciliados presentan un complejo patrón de subunidades corticales, con una disposición precisa de los orgánulos y de las hileras de cilios (Shang *et al.*, 2002; Kaczanowska *et al.*, 2003). Cada célula tiene polaridad antero-posterior y asimetría entre los lados izquierdo y derecho, observándose ambas no sólo en la organización general de la célula sino también en la estructura de cada unidad cortical (cinétida) (Aufderheide *et al.*, 1999; Iftode y Fleury-Aubusson, 2003; Kaczanowska *et al.*, 2003). El desarrollo y la disposición de las cinétidas pueden visualizarse con microscopía óptica mediante impregnación con plata y técnicas de inmunofluorescencia, así como mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido (Iftode y Fleury-Aubusson, 2003; Kaczanowska *et al.*, 2003).

Existen diferencias entre especies de ciliados en el origen de los cinetosomas, así como en el desarrollo de la estomatogénesis (Díaz *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004; Agatha y Riedel-Lorjé, 2006; Ma *et al.*, 2006). Small (1967) erigió el orden Scuticociliatida en base a su estomatogénesis ‘escuticobucocinetal’: la infraciliatura oral deriva o de la membrana paraoral y de la escutica localizada posterior o paralelamente a la membrana paraoral, o sólo de la membrana paraoral (Foissner, 1996).

La fisión binaria se produce perpendicularmente al eje longitudinal celular, originando una célula desde la parte anterior (*proter*) y otra desde la posterior (*opiste*). En la separación de las células (citocinesis) intervienen elementos contráctiles situados en un área con forma de anillo bajo el surco de fisión (Hirono *et al.*, 1987; Numata y Gonda, 2001; Hosein *et al.*, 2003). El primer paso visible en la estomatogénesis es la producción de nuevos cinetosomas en una región específica de la corteza, que se agrupan para formar el primordio oral, tras lo que los componentes orales se completan y ensamblan posteriormente siguiendo el patrón específico de cada ciliado.

En nuestro laboratorio se mantienen actualmente varios aislados del escuticociliado *Philasterides dicentrarchi*, todos ellos procedentes de brotes de escuticociliatosis ocurridos en rodaballo. Los cultivos se manejan siempre en paralelo, para minimizar las diferencias debidas al manejo; esto es, están todos a la misma Tª, salinidad, pH, etc., puesto que se utiliza el mismo lote de medio de cultivo para todos los pases, y los pases de los frascos de cultivo se realizan simultáneamente, así como los pases por pez.

Inicialmente, se observó que en los cultivos de dos de los aislados (S1 y D2) aparecían individuos de formas amorfas, que llegaban a triplicar el tamaño de un individuo normal. Los cultivos empezaron a mostrar una elevada reducción en el crecimiento, así como una gran dificultad a la hora de infectar a los peces.

El objetivo de este trabajo es investigar en qué nivel se encuentra la alteración de estos aislados, mediante pruebas ecológicas, serológicas y genéticas, entre otras.

RESULTADOS

Análisis morfológico de los ciliados alterados

Para la caracterización morfológica de los aislados de *P. dicentrarchi* existentes en el laboratorio, se han examinado al microscopio óptico, tras la impregnación con carbonato de plata amoniacal, sobre unos mil individuos de cada uno de los siete aislados, llamados B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1 (Budiño *et al.*, 2011). De entre todos estos individuos, se encontraron 5 casos en que los ciliados, pertenecientes a los aislados B1 y I1, mostraban anomalías (dos de estos individuos anormales se muestran en la Figura 45), que consistían en la total desorganización de las cinetias y la aparición de dos aparatos bucales, así como un aumento de tamaño. A partir de estos datos, si calculamos la probabilidad de alteración en los cultivos normales, se obtiene una tasa de aparición de alteraciones de aproximadamente un 0,07%.

Los cultivos en los que aparecieron estos individuos alterados mantuvieron su desarrollo normal, sin que se observara un aumento en su proporción, o una reducción de su tasa de crecimiento.

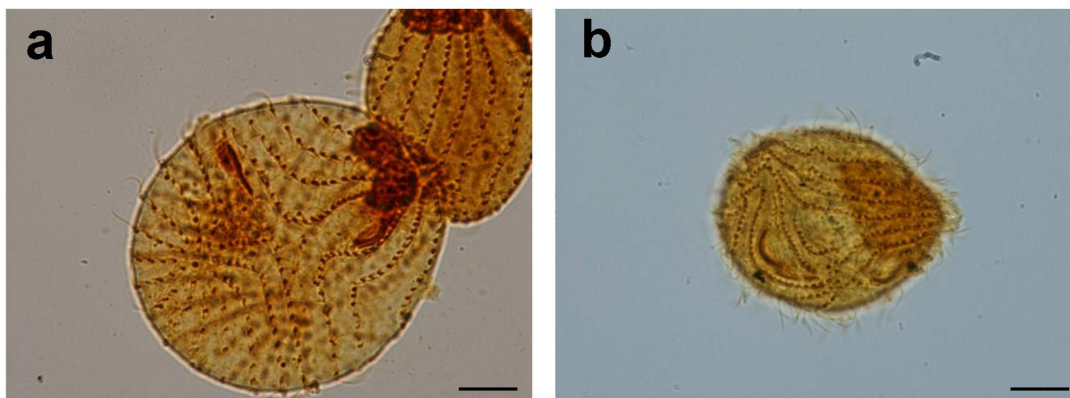


Figura 45. Alteraciones espontáneas encontradas en individuos de *Philasterides dicentrarchi* procedentes de cultivos normales de los aislados I1 y B1, impregnados con carbonato de plata amoniacal. En las fotografías se observa la total desorganización de las cinetias y la presencia de dos aparatos bucales, que no parecen totalmente formados. La barra corresponde a 10 μ m.

En dos de los cultivos de los aislados D2 y S1, sin embargo, todos los cultivos aparecieron alterados tras un pase por pez, y se observó un cambio del comportamiento global del cultivo.

A la vista de las fotografías de los ciliados impregnados con carbonato de plata amoniacal (Fig. 46), se puede observar que estos parecen presentar una alteración en el proceso de estomatogénesis. Aunque los individuos alterados parecen ser capaces de formar las estructuras bucales pertenecientes al futuro opister, éstas no llegan a ocupar el lugar que les corresponde, permaneciendo la mayoría de las veces. Los individuos parecen, además, no ser capaces de completar el proceso de fisión celular, una vez formados los dos aparatos bucales, y la gran mayoría de los individuos de los cultivos poseen dos aparatos bucales, enfrentados en horizontal con respecto al eje corporal del ciliado. Por otra parte, en los ciliados se puede apreciar un aumento del número normal de cinetias somáticas, pasando éstas de 13-15 (ver capítulo 1) a prácticamente el doble, así como una desorganización de éstas.

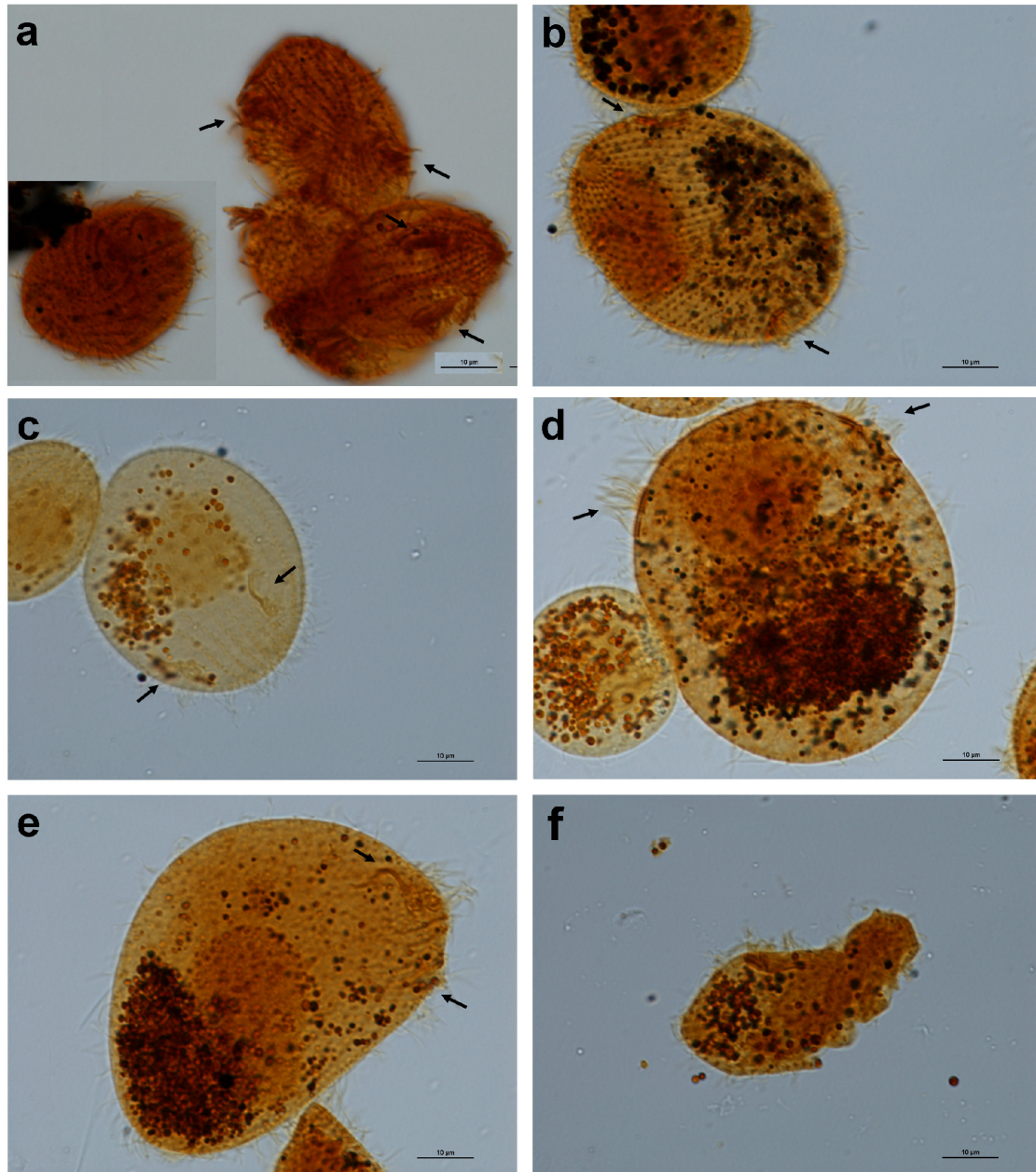


Figura 46. Individuos impregnados con carbonato de plata amoniacal pertenecientes a los fenotipos alterados de los aislados S1 (a, b, e) y D2 (c, e, f). En las fotografías puede observarse claramente la desorganización de las cinetias a lo largo del plano corporal de los ciliados (a), así como el aumento desmesurado en su número que sufren algunos de los individuos (b). La mayor parte de los individuos en los cultivos presentan dos aparatos bucales (señalados por flechas) (a, b, c, d, e), la mayoría de las veces enfrentados en el plano horizontal. Además, también son visibles las enormes alteraciones en la forma (e, f) y tamaño (d, e) que sufren algunos de los individuos alterados, resultado de consecutivas divisiones fallidas. La barra representa 10 µm.

Análisis del crecimiento de los aislados alterados y no alterados

Se puede observar, para los dos aislados, que los ciliados alterados presentan una reducción significativa de la tasa de crecimiento con respecto a los aislados originales (Fig. 47).

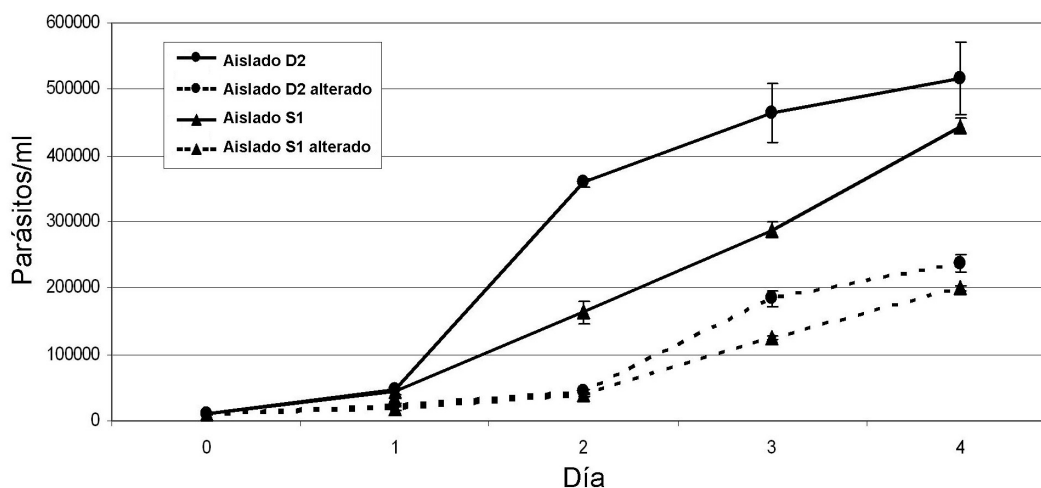


Figura 47. Comparación de las cinéticas de crecimiento durante 4 días de los aislados alterados y no alterados D2 y S1 de *Philasterides dicentrarchi* en medio L-15 completo suplementado con 10% FBSi y 1% de solución PSA. Los datos son los valores medios de tres réplicas paralelas de cada aislado, y su desviación estándar se muestra en la gráfica

SDS-PAGE y Western blot

A la vista del patrón polipeptídico obtenido por SDS-PAGE de los aislados D2 y S1 alterados y no alterados (Fig. 48A), podemos apreciar diferencias en las bandas de 28, 36 y 50 kDa, en el caso de los geles bajo condiciones no reductoras, y en una banda de 38 kDa, en el caso de los geles bajo condiciones reductoras. Es interesante señalar que para los dos aislados, D2 y S1, las diferencias en los patrones alterados aparecen exactamente en los mismos lugares con respecto a los patrones originales.

Lo mismo sucede en el patrón polipeptídico obtenido por Western blot (Fig 48B), en el que los carriles correspondientes a cada aislado se enfrentaron con el correspondiente anti-suero del aislado original.

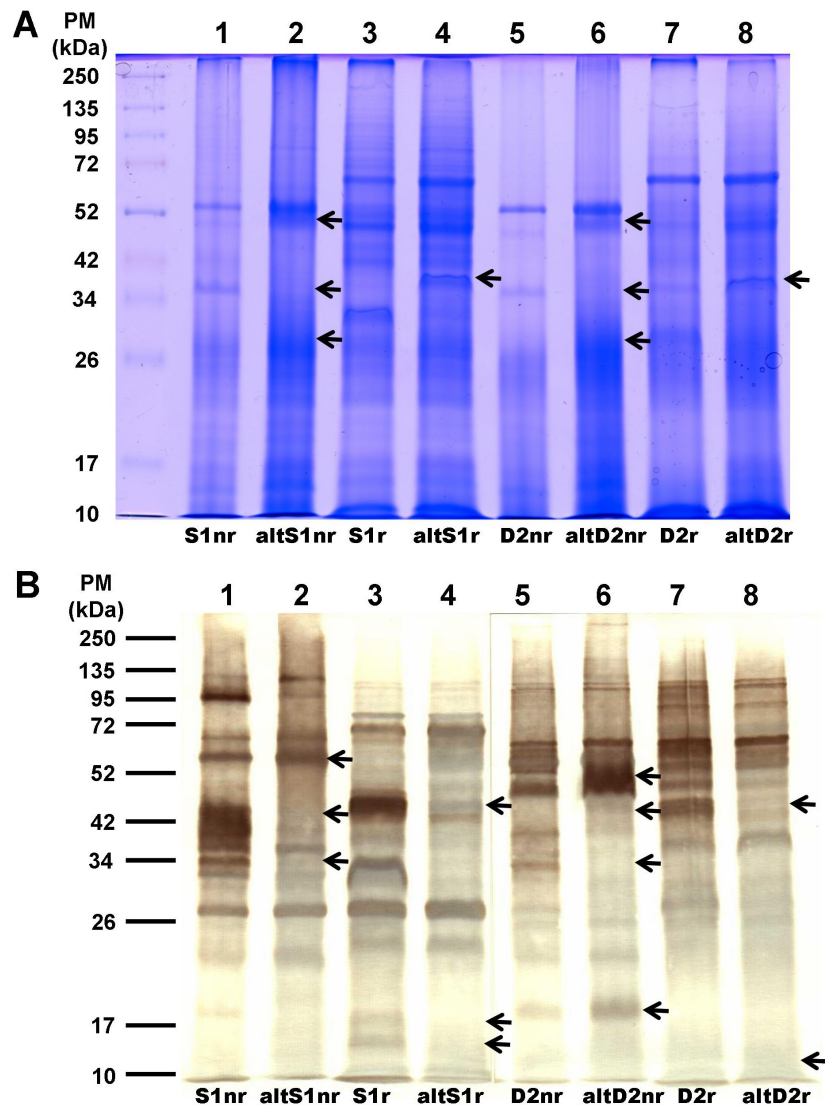


Figura 48. Patrones polipeptídicos de los aislados alterados y no alterados, obtenidos mediante SDS-PAGE (A) y Western blot (B). Para las dos figuras, los carriles 1 y 5 corresponden a los lisados de los aislados S1 y D2, respectivamente, bajo condiciones no reductoras; los carriles 2 y 6 corresponden a los lisados de los aislados S1 y D2 alterados, respectivamente, bajo condiciones no reductoras; los carriles 3 y 7 corresponden a los lisados de los aislados S1 y D2, respectivamente, bajo condiciones reductoras; los carriles 4 y 8 corresponden a los lisados de los aislados S1 y D2 alterados, respectivamente, bajo condiciones reductoras. Para el Western blot, los lisados se enfrentaron con los anticuerpos obtenidos en ratón frente a su correspondiente aislado de pertenencia (S1 o D2) no alterado. Las flechas a la derecha de los carriles, tanto en el gel como en el Western blot, indican los lugares con diferencias en el patrón polipeptídico de los antígenos de los aislados alterados con respecto a los antígenos de los aislados sin alteraciones.

PCR y secuenciación de la β -tubulina

La figura 49 muestra la comparación de las secuencias del gen de la β -tubulina de las cepas originales (D2 y S1) y alteradas (altD2 y altS1). Para el aislado D2, no existen diferencias entre el gen de la β -tubulina del aislado original y el alterado. Sin embargo, en el caso del aislado S1, se observa un cambio de una timina por una citosina en la posición de 249 pb, que se marca entre cajas en la figura.

A	D2	ACGTTTACTATAACGAAGCTACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATT	60
	altD2	ACGTTTACTATAACGAAGCTACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATT	60
	D2	TGGAACCCGGTACCATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTG	120
	altD2	TGGAACCCGGTACCATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTG	120
	D2	ATAACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAAT	180
	altD2	ATAACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAAT	180
	D2	GTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGG	240
	altD2	GTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGG	240
	D2	GCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGA	300
	altD2	GCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGA	300
	D2	AAAGAAGCTGAAGGATGTGATTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGA	360
	altD2	AAAGAAGCTGAAGGATGTGATTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGA	360
	D2	GGAAGTGGATCCGGAAT	377
	altD2	GGAAGTGGATCCGGAAT	377
B	S1	ATAACGAAGCTACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTGGAACCCG	60
	altS1	ATAACGAAGCTACTGGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTGGAACCCG	60
	S1	GTACCATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGT	120
	altS1	GTACCATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGT	120
	S1	AATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAA	180
	altS1	AATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAATTAAA	180
	S1	ATTAAATAATTAAATAGCGTTTTTCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGA	240
	altS1	ATTAAATAATTAAATAGCGTTTTTCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGA	240
	S1	CACTACACCTGAAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCT	300
	altS1	CACTACACCTGAAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCT	300
	S1	GAAGGATGTGATTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAACCTGGA	360
	altS1	GAAGGATGTGATTGCTTATAAGGATTCTAAATCACCCACTCTTTAGGAGGAGGAACCTGGA	360
	S1	TCCGGAAT	368
	altS1	TCCGGAAT	368

Figura 49. Alineamiento de las secuencias de la β -tubulina de *Philasterides dicentrarchi* de los aislados comparados D2 (A) y S1 (B) alterados y no alterados, obtenidos con el programa ClustalW v 2.0.12. Los cuadros marcan las diferencias entre la cepa no alterada y la alterada.

DISCUSIÓN

Los individuos alterados de los dos aislados de *P. dicentrarchi* comparten las siguientes características: disminución de la tasa de crecimiento, así como de la motilidad de los individuos; desorganización de las cinetias, y a menudo duplicación de su número; dificultad a la hora de separarse las células hijas, lo que da lugar a individuos de formas amorfas, mayoritariamente con dos aparatos orales; y dificultad para infectar a los rodaballos mediante inyección intraperitoneal.

El análisis serológico comparado de los aislados alterados y sus correspondientes aislados originales pone de manifiesto alteraciones en el patrón proteico de los dos aislados alterados, en proteínas aparentemente de igual tamaño, que podrían ser las mismas. Tras el análisis genético de la β -tubulina, sin embargo, los resultados obtenidos son contradictorios, ya que en el aislado alterado S1 se observa una mutación que afecta sólo a una base nitrogenada y que no aparece en el aislado alterado D2, lo que hace poco posible que esta sea la causa de la alteración, a pesar de que sólo se ha secuenciado un fragmento del gen.

Se han dado casos de mutaciones causantes de alteraciones morfológicas en un gran número de ciliados. Las más estudiadas han sido las que afectan a la especie *Tetrahymena termophila*, recopiladas por Frankel (2008) en una revisión reciente.

Se han descrito mutaciones que generan fenotipos con las cinetias desorganizadas, como por ejemplo el mutante *disA* de *T. termophila*, (Jerka-Dziadosz *et al.*, 1995), o el mutante termosensitivo *sm19* de *P. tetraurelia*, que exhibe una duplicación de los cuerpos basales (Ruiz *et al.*, 1987). En nuestro caso, en los individuos de *P. dicentrarchi* alterados no parece existir una duplicación del número de cuerpos basales en cada cinetia, sino un aumento desmesurado en el número de cinetias somáticas, y es una característica que se puede observar en aproximadamente un 25% de los individuos del cultivo alterado.

Otra de las mutaciones que da lugar a un fenotipo parecido al nuestro es la mutación *janus* (Jerka-Dziadosz y Frankel, 1979; Frankel *et al.*, 1984), cuyos mutantes expresan un fenotipo en el que se da una alteración sistémica en la geometría de las estructuras celulares alrededor de la circunferencia de la célula, exhibiendo la superficie ventral anormal una imagen-espejo de la superficie dorsal (Strzyzewska-Jówko *et al.*, 2003), y mostrando las células mutadas, por consiguiente, dos aparatos orales (uno normal y otro secundario anormal), una modificación de la disposición asimétrica de los pares basales apicales y una posición alterada de los poros de la vacuola contráctil (Frankel *et al.*, 1984).

La formación de dobletes gemelos-siameses, en los que la superficie dorsal es reflejada en una superficie ventral está documentada en un gran número de especies de ciliados, como *T. termophila* (Nanney *et al.*, 1975; Jerka-Dziadosz y Frankel, 1979; Frankel y Nelson, 1986), *T. pustulata* (Yano y Suhama, 1991), *Paramecium tetraurelia* (Sonneborn, 1963), *Gastrostyla setifera* (Pedroso Dias *et al.*, 2007), *Leucophrys patula* (Fauré-Fremiet, 1945, 1948), *Stentor coeruleus* (Tartar, 1956) y *Paraurostyla weissei* (Jerka-Dziadosz, 1985), entre otros. Se demostró que estos dobletes podían propagarse y perpetuar su condición de doblete (Fauré-Fremiet, 1945, 1948; Tartar, 1956). Las características que muestran estos dobletes de imagen-reflejada son un aumento en el número de cinetias somáticas, aparición de dos aparatos orales (uno de los cuales es anormal) y aparición de dos sets de poros de la vacuola contráctil. Nuestros individuos alterados, no obstante, no se corresponden con estos dobletes, ya que los dos aparatos orales enfrentados que nosotros encontramos no se corresponden con una imagen-reflejada, sino con una copia paralela.

En la especie *T. termophila* se identificó un gen de la actina (llamado *ACT1*), cuya alteración provoca que las células hijas fallen a la hora de separarse y reintegrarse; los individuos mutantes también muestran una disminución de la motilidad y un aumento de la longitud corporal, que llega a ser el doble que la de los controles sin mutar; además, aunque la elongación de las cinetias y la formación de las estructuras orales son normales, las cinetias de las células hijas

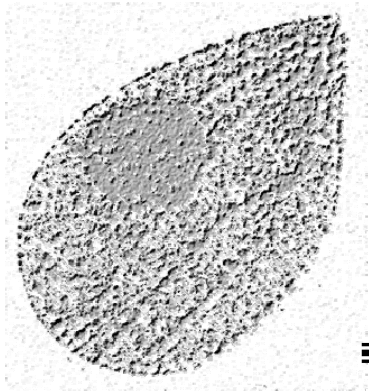
resultan lateralmente desplazadas, y a menudo se unen indiscriminadamente a través del surco de división (Williams *et al.*, 2006). El fenotipo de *T. termophila* resultante de la mutación de este gen presenta unas características también similares a las encontradas por nosotros en los dos aislados alterados estudiados aquí.

Aunque existen varios casos de mutaciones en ciliados que causan la aparición de fenotipos similares al que nosotros nos hemos encontrado, parece que no se da la coincidencia de todas las características en un mismo cultivo alterado, si bien algunas de las mutaciones descritas son aditivas. Además, la mayoría de las alteraciones descritas en ciliados que provocan la aparición de las características descritas para los individuos alterados de *P. dicentrarchi* analizados en este estudio parecen estar provocadas por choques térmicos (Tröger y Hausmann, 2005) o adición de productos químicos como, por ejemplo, la nitrosoguanidina (Jerka-Dziadosz y Frankel, 1979; Jerka-Dziadosz *et al.*, 1995). Sin embargo, no tenemos constancia de que esta haya sido la causa de la alteración en nuestros aislados, puesto que la temperatura se mantuvo siempre constante a 21 °C, y sólo 2 aislados de todos los que poseemos presentan esta alteración. El cultivo de varios aislados de *P. dicentrarchi* a 28 °C no ha dado como resultado ningún tipo de alteración en los ciliados.

Un estudio reciente realizado en el ciliado *Didinium cf. nasutum* muestra la aparición de un fenotipo con morfología anormal y cinetias desorganizadas, donde son frecuentes las fases de fisión irregular, que dan lugar a la aparición de individuos con 2, 3 o 4 probóscides. Este fenotipo es inducible por exposición a choques térmicos de 15 minutos a 30 °C (Tröger y Hausmann, 2005). Sin embargo, en esta especie ya se han descrito casos de formas irregulares que sucedían de forma espontánea (Beers, 1933), y no es infrecuente la aparición de forma natural de individuos fusionados por los extremos posteriores, que alcanzan dos o tres veces el tamaño normal y que tienen todas las partes de un individuo normal duplicadas (Mast, 1909).

En nuestros cultivos alterados, la alteración parece afectar al 100% de los individuos del cultivo y, si bien la tasa de crecimiento presenta una disminución muy pronunciada en comparación con los cultivos sin alterar, estas anomalías morfológicas parecen no afectar a la viabilidad de los individuos, dado que llevan más de un año en cultivo. Parece improbable que esta alteración se corresponda con una mutación genética espontánea, ya que la probabilidad de éstas en la naturaleza es de aproximadamente 10^{-7} en células haploides y 10^{-14} en células diploides (Griffiths *et al.*, 1999), y en nuestro caso el 100% de los individuos del cultivo están alterados. La tasa de aparición de individuos alterados en los cultivos normales sería, según nuestros datos, aproximadamente de un 0,07%.

Ya que las alteraciones en ambos aislados sucedieron a partir de un pase de los ciliados por pez, es posible que se deba a una alteración metabólica provocada por los mecanismos de defensa del rodaballo ante la infección, y no a una mutación genética. Pero, si esto fuera así, la población alterada no se mantendría en el tiempo. Son necesarios otros estudios para determinar el origen de esta alteración irreversible.



Capítulo 6

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA EN UNA DISCIFACTORIA

En estudios previos llevados a cabo a finales del año 2007, se obtuvieron dos aislados de *P. dicentrarchi* de rodaballo (llamados D2 y D3) en una piscifactoría localizada en Galicia (NO España). Se observaron que ambos aislados mostraban diferencias a nivel genético, serológico y de virulencia, sugiriendo que se trataba de dos cepas distintas de *P. dicentrarchi*. Con estos datos, se llevó a cabo un estudio específico en esta piscifactoría durante el año 2009, con el fin de determinar el número de cepas de *P. dicentrarchi* presentes en ella y las relaciones ecológicas entre ellas.

La piscifactoría utiliza la tecnología de recirculación (*Recirculation Aquatic System*, RAS), un sistema de producción cerrado que requiere pequeñas cantidades de agua y es poco contaminante. Consta de tres sistemas independientes de recirculación (Fig. 50), cada uno de ellos con filtros mecánicos, biofiltros de lecho fluidizado y espumadores: uno distribuido en 16 tanques de 12 m³ (SISTEMA A), otro distribuido en 20 tanques de 20 m³ (SISTEMA B) y otro con 40 tanques de 40 m³ (SISTEMA C). La incorporación de alevines a la granja ocurre todos los meses, y al llegar son introducidos en el sistema A, en el que se llevan a cabo muestreos en busca de patógenos potenciales que pudieran ser incorporados a la piscifactoría. Sólo cuando se tiene la seguridad de que los alevines están sanos, son transferidos a los sistemas B y C.

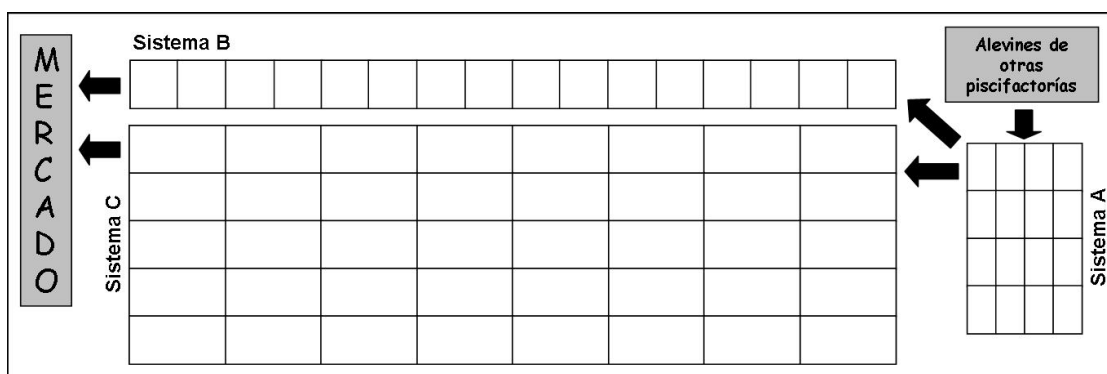


Figura 50. Esquema de la piscifactoría. La planta consta de 3 sistemas de recirculación independientes; el sistema A con 16 tanques de 12 m³, el sistema B con 16 tanques de 20 m³ y el sistema C con 40 tanques de 40 m³. En el sistema C, el tamaño de los rodaballos va aumentando de arriba hacia abajo. El sistema A recibe las incorporaciones de alevines a la planta, y desde aquí los alevines son transferidos a los otros dos sistemas cuando se tiene la seguridad de que están sanos.

La temperatura del agua durante el año osciló entre los 13,8-19,1°C, la salinidad entre el 32-37 ‰, el oxígeno disuelto entre 8.6-12.54 mg l⁻¹ y el pH entre 6,6-7,7.

RESULTADOS

Obtención de muestras y cultivo de los parásitos

Los muestreos de peces se realizaron mensualmente durante el año 2009. La planta de cultivos se dividió en lotes de peces, y se muestrearon 2 peces de cada lote. La selección de peces no se realizó al azar, sino que se intentó seleccionar a aquellos peces que mostraban síntomas de escuticociliatosis.

Los peces se sacrificaron por exceso de anestesia y se extrajeron muestras de cerebro que fueron depositadas en placas de medio marino para amebas (ATCC medium 994; LGC Standards, Barcelona, España). En las placas donde hubo crecimiento, los ciliados se transfirieron a frascos de cultivo de 10 cm³ (Nunc) con medio L15 con solución PSA. Cuando los restos celulares fueron eliminados de los cultivos, éstos fueron transferidos a frascos con medio L15 completo con un 10% de FBSi y solución PSA (Iglesias *et al.*, 2003a).

Las fechas de obtención de los distintos aislados, las propiedades físico-químicas del agua en el momento del muestreo y el lote de procedencia y peso de los rodaballos se muestran en la Tabla 11.

AISLADOS	FECHA DE AISLAMIENTO	SISTEMA DE ORIGEN	T (°C)	SALINIDAD (‰)	LOTE	PESO DEL RODABALLO (g)
						Media ±Desviación estándar
D2	Septiembre 2007	C	16,8	32	-	-
D3	Noviembre2007	C	13,8	37	-	-
D4	Noviembre2007	C	13,8	37	-	-
D6	Marzo 2009	C	16,7	33	I	190 ± 17
D7	Abril 2009	C	17,2	35	II	469 ± 41
D8	Mayo 2009	C	17	34	II	498 ± 55
D9	Junio 2009	C	18,1	32	III	439 ± 97
D10	Julio 2009	C	17,8	33	II	361 ± 79
D11	Agosto 2009	A	22	32	VI	251 ± 55
D13	Septiembre	B	18,2	33	VII	140 ± 31

Tabla 11. Detalles de los aislados de *Philasterides dicentrarchi* utilizados en este estudio. La columna lote se refiere a diferentes grupos de alevines que fueron incorporados a la piscifactoría.

Análisis morfológico de los aislados

La identificación de los aislados de *P. dicentrarchi* se llevó a cabo mediante el examen morfológico al microscopio óptico de ciliados impregnados con carbonato de plata amoniacal con piridina siguiendo la descripción de Iglesias *et al.* (2001), que se puede consultar en el capítulo 1, realizándose adicionalmente un detallado estudio biométrico que se presenta en la Tabla 12, con el fin de establecer la posible existencia de morfotipos entre los aislados.

Todos los aislados mostraron las características morfológicas básicas (Fig. 51) que los identifican como individuos de la especie *P. dicentrarchi* (ver Tabla 3, capítulo 1).

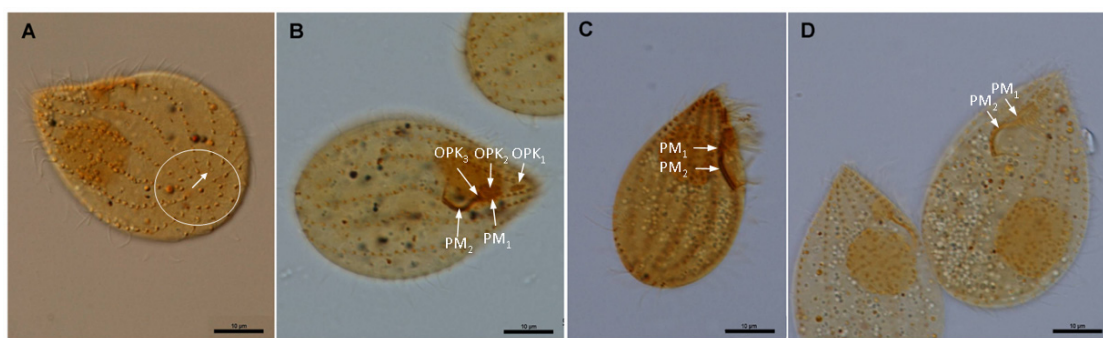


Figura 51. Detalles de individuos impregnados con carbonato de plata amoniacal, pertenecientes a los aislados D8 (A), D10 (B), D2 (C) y D11 (D) del ciliado *P. dicentrarchi*. A la vista de las fotografías, se pueden observar algunas de las características morfológicas que caracterizan a esta especie, como el aparato bucal formado por 3 policinétidas orales y una membrana paraoral dividida en dos partes bien diferenciadas, el número de cinetias somáticas (que suele ser 13-15) y el poro de la vacuola contráctil, localizado al final de la 2ª cinetia. En todas las fotografías, la barra corresponde a 10 μm.

Con los datos obtenidos de la caracterización morfométrica de los diez aislados (Tabla 12) se realizó un análisis discriminante canónico (CDA) (Fig. 52). El porcentaje total de casos agrupados correctamente mediante este análisis fue del 51,8% (85% para el aislado D2, 40% para el D3, 47,4% para el D4, 57,9% para el D6, 52,6% para el D7 y D8, 40% para el D9, 42,9% para el D10, 63,2% para el D11 y 36,8% para el D13). En el gráfico de dispersión (Fig. 52) también se puede observar que el aislado D2 está separado claramente de los demás aislados presentando un claro morfotipo (“morfotipo D2”), y tampoco existe solapamiento entre los aislados D3, D6 y D11 mientras que, sin embargo, los demás aislados presentan un elevado grado de solapamiento entre ellos. Así, los aislados D8 y D10 pertenecerían al “morfotipo D3”, los aislados D7 y D13

pertenecerían al “morfotipo D6” y los aislados D4, D9 y D10 pertenecerían al “morfotipo D11”.

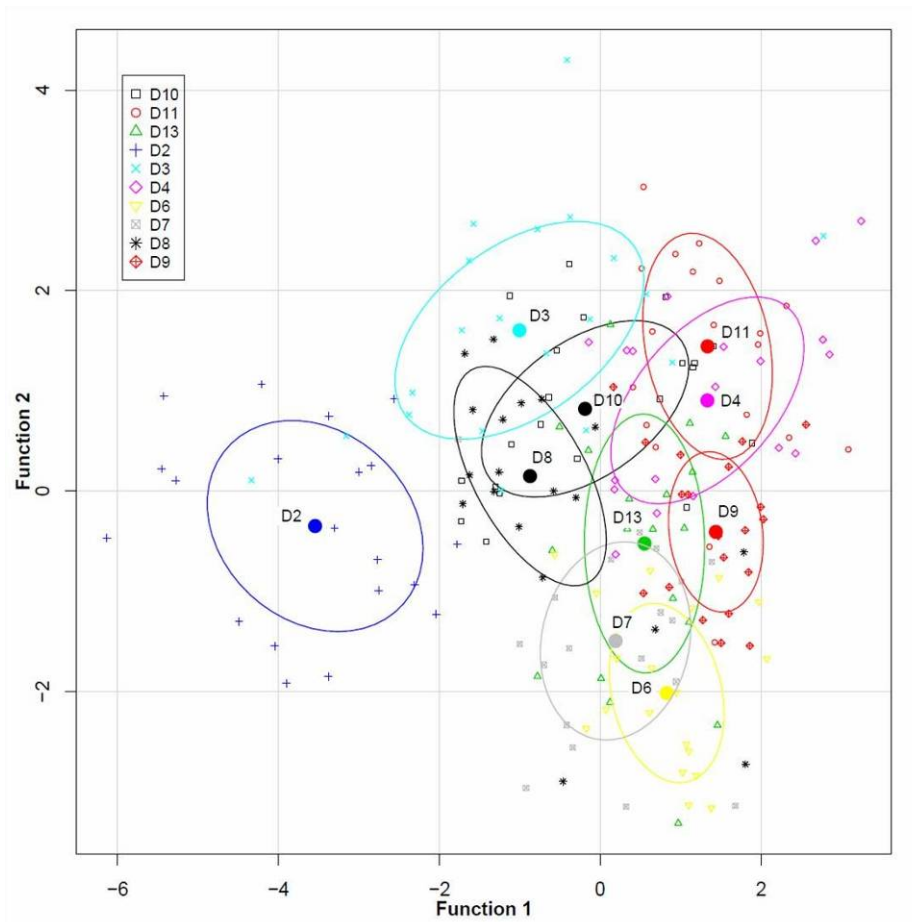


Figura 52. Gráfico de dispersión de las funciones discriminantes 1 y 2 generado por el CDA realizado a partir de la caracterización morfométrica (basada en mediciones de las dimensiones corporales y del aparato bucal, y su disposición en el cuerpo del ciliado) de los diez aislados de *P.dicentrarchi*. Se muestran los centroides de cada aislado y las elipses con un nivel de confianza del 95%.

CARACTERES	D2	D3	D4	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D13
Dimensiones corporales										
Longitud	43,385 ± 3,402 (35,36 a 50,85)	47,431 ± 4,270 (37,94 a 57,66)	46,525 ± 2,755 (38,89 a 51,84)	41,919 ± 2,385 (37,94 a 57,66)	41,619 ± 3,111 (35,90 a 46,97)	43,250 ± 2,353 (39,22 a 48,38)	44,759 ± 2,797 (39,51 a 50,80)	45,383 ± 3,016 (38,12 a 50,85)	45,632 ± 2,704 (40,43 a 52,43)	42,814 ± 3,496 (35,93 a 48,82)
Ancho	28,512 ± 3,878 (20,20 a 37,57)	27,700 ± 3,908 (19,23 a 38,28)	27,870 ± 2,784 (22,050 a 34,68)	21,739 ± 2,237 (16,93 a 26,20)	22,331 ± 2,700 (17,37 a 29,59)	25,484 ± 3,065 (20,41 a 34,21)	24,603 ± 2,196 (20,74 a 29,78)	28,041 ± 2,750 (22,57 a 34,08)	27,311 ± 2,849 (21,25 a 33,37)	22,619 ± 3,058 (17,36 a 30,70)
L/A	1,537 ± 0,143 (1,30 a 1,94)	1,730 ± 0,169 (1,38 a 2,13)	1,681 ± 0,145 (1,37 a 2,02)	1,942 ± 0,163 (1,63 a 2,42)	1,878 ± 0,154 (1,59 a 2,17)	1,715 ± 0,171 (1,36 a 2,00)	1,823 ± 0,125 (1,57 a 2,12)	1,627 ± 0,117 (1,43 a 1,93)	1,682 ± 0,129 (1,48 a 2,00)	1,909 ± 0,151 (1,54 a 2,13)
Ciliatura oral										
Longitud PM1	3,553 ± 0,467 (2,73 a 4,73)	3,952 ± 0,453 (2,90 a 5,15)	4,270 ± 0,317 (3,80 a 4,99)	3,805 ± 0,368 (3,04 a 4,33)	3,700 ± 0,368 (3,17 a 4,52)	3,883 ± 0,383 (3,32 a 4,82)	4,068 ± 0,321 (3,41 a 4,56)	4,179 ± 0,344 (3,57 a 4,84)	4,108 ± 0,356 (3,60 a 4,90)	3,768 ± 0,389 (3,04 a 4,47)
Longitud PM2	6,445 ± 0,746 (5,00 a 8,09)	8,420 ± 1,120 (6,24 a 10,80)	8,575 ± 0,811 (7,09 a 9,99)	7,305 ± 0,592 (6,11 a 8,48)	7,075 ± 0,509 (6,14 a 8,05)	7,604 ± 0,471 (6,72 a 8,37)	8,081 ± 0,515 (7,18 a 9,14)	8,161 ± 0,715 (6,77 a 9,02)	9,029 ± 0,693 (7,03 a 10,11)	7,904 ± 0,472 (7,15 a 8,64)
Longitud OPK1	2,761 ± 0,296 (2,14 a 3,51)	3,114 ± 0,361 (2,18 a 3,96)	3,256 ± 0,248 (2,68 a 3,71)	2,981 ± 0,2371 (2,55 a 3,31)	2,914 ± 0,394 (2,06 a 3,51)	2,995 ± 0,340 (2,26 a 3,54)	3,226 ± 0,219 (2,96 a 3,59)	3,198 ± 0,353 (2,53 a 3,77)	3,254 ± 0,422 (2,04 a 3,95)	3,036 ± 0,390 (3,80 a 2,21)
Ancho OPK1	0,908 ± 0,149 (0,60 a 1,22)	0,926 ± 0,122 (0,67 a 1,25)	0,972 ± 0,118 (0,75 a 1,14)	0,907 ± 0,094 (0,74 a 1,10)	0,866 ± 0,083 (0,71 a 1,05)	0,910 ± 0,119 (0,71 a 1,13)	0,915 ± 0,101 (0,71 a 1,16)	0,974 ± 0,190 (0,67 a 1,39)	0,995 ± 0,153 (0,72 a 1,24)	0,979 ± 0,130 (0,73 a 1,14)
Longitud OPK2	2,719 ± 0,394 (1,98 a 3,36)	3,305 ± 0,422 (2,40 a 4,05)	3,875 ± 0,406 (3,25 a 4,55)	3,265 ± 0,342 (2,67 a 3,95)	3,246 ± 0,378 (2,72 a 3,87)	3,157 ± 0,250 (2,73 a 3,66)	3,507 ± 0,338 (3,06 a 4,18)	3,425 ± 0,442 (2,60 a 4,46)	3,737 ± 0,333 (2,98 a 4,15)	3,279 ± 0,338 (2,51 a 3,93)
Ancho OPK2	1,353 ± 0,209 (0,94 a 1,83)	1,530 ± 0,261 (1,15 a 2,32)	1,704 ± 0,168 (1,40 a 1,93)	1,563 ± 0,167 (1,30 a 1,90)	1,574 ± 0,168 (1,21 a 1,84)	1,543 ± 0,230 (1,15 a 2,18)	1,807 ± 0,197 (1,41 a 2,15)	1,547 ± 0,194 (1,24 a 1,93)	1,795 ± 0,139 (1,46 a 2,02)	1,685 ± 0,195 (1,32 a 2,08)
Longitud OPK3	1,498 ± 0,246 (1,06 a 1,99)	1,519 ± 0,245 (1,12 a 2,00)	1,493 ± 0,161 (1,27 a 1,82)	1,301 ± 0,118 (1,08 a 1,55)	1,302 ± 0,146 (1,05 a 1,71)	1,449 ± 0,234 (1,13 a 1,92)	1,547 ± 0,171 (1,37 a 1,98)	1,417 ± 0,157 (1,01 a 1,75)	1,559 ± 0,143 (1,32 a 1,81)	1,463 ± 0,228 (1,10 a 1,83)
Ancho OPK3	0,815 ± 0,122 (0,61 a 1,10)	0,724 ± 0,109 (0,48 a 0,96)	0,705 ± 0,133 (0,50 a 0,92)	0,655 ± 0,105 (0,50 a 0,89)	0,629 ± 0,077 (0,51 a 0,74)	0,672 ± 0,126 (0,47 a 0,91)	0,698 ± 0,066 (0,57 a 0,80)	0,703 ± 0,113 (0,54 a 0,95)	0,768 ± 0,082 (0,65 a 0,94)	0,696 ± 0,119 (0,50 a 1,02)
Distancia OPK1-OPK2	1,695 ± 0,453 (0,91 a 2,87)	1,561 ± 0,413 (0,93 a 2,59)	1,489 ± 0,385 (0,85 a 2,10)	1,537 ± 0,299 (0,82 a 1,99)	1,365 ± 0,421 (0,79 a 2,10)	1,638 ± 0,340 (1,21 a 2,25)	1,451 ± 0,433 (0,65 a 2,70)	1,497 ± 0,398 (1,01 a 2,36)	1,534 ± 0,400 (0,92 a 2,39)	1,789 ± 0,459 (1,01 a 2,55)
Distancia OPK2-OPK3	0,720 ± 0,143 (0,46 a 1,19)	0,765 ± 0,160 (0,51 a 1,18)	0,608 ± 0,080 (0,45 a 0,72)	0,536 ± 0,082 (0,41 a 0,67)	0,586 ± 0,136 (0,41 a 1,00)	0,636 ± 0,128 (0,43 a 0,86)	0,598 ± 0,087 (0,35 a 0,78)	0,821 ± 0,179 (0,50 a 1,15)	0,711 ± 0,126 (0,50 a 0,96)	0,672 ± 0,183 (0,45 a 1,22)
Dist. ápice-extremo ant. OPK1	4,296 ± 0,711 (2,82 a 6,06)	4,112 ± 0,764 (2,48 a 5,54)	3,626 ± 0,733 (2,40 a 4,97)	3,077 ± 0,493 (1,73 a 5,76)	3,134 ± 0,622 (1,57 a 4,25)	3,838 ± 0,878 (2,54 a 5,55)	3,124 ± 0,802 (1,58 a 4,32)	3,389 ± 0,862 (1,89 a 5,12)	3,393 ± 0,873 (2,20 a 4,72)	3,671 ± 0,886 (2,33 a 4,97)
Longitud del campo bucal	18,517 ± 1,384 (14,35 a 21,64)	20,256 ± 1,757 (15,58 a 24,32)	20,239 ± 1,533 (16,30 a 22,25)	17,699 ± 0,838 (15,89 a 19,29)	17,615 ± 1,509 (14,76 a 19,54)	19,027 ± 1,610 (16,45 a 21,52)	18,937 ± 1,158 (17,00 a 20,99)	18,896 ± 1,674 (15,92 a 21,46)	19,771 ± 1,424 (17,12 a 22,72)	19,103 ± 1,935 (14,49 a 22,01)
L. campo bucal/L. corporal	0,425 ± 0,027 (0,35 a 0,51)	0,426 ± 0,028 (0,35 a 0,49)	0,440 ± 0,033 (0,39 a 0,54)	0,419 ± 0,022 (0,36 a 0,46)	0,430 ± 0,020 (0,40 a 0,47)	0,438 ± 0,045 (0,33 a 0,51)	0,427 ± 0,016 (0,40 a 0,45)	0,423 ± 0,032 (0,37 a 0,49)	0,432 ± 0,038 (0,37 a 0,50)	0,442 ± 0,029 (0,40 a 0,50)

Tabla 12. Características biométricas de los diez aislados de *Philasterides dicentrarchi*. Los datos corresponden a la media ± desviación estándar y el rango (entre paréntesis), en µm, de 50 individuos de cada aislado. Abreviaturas: L = longitud; A = ancho; OPK1, 2, 3 = polcinetidas orales 1, 2 y 3; MP1, 2 = partes 1 y 2 de la membrana paroral

Ensayo de crecimiento *in vitro* de los aislados

Las cinéticas de crecimiento de los distintos aislados se muestran en la Figura 53. Como se puede observar, las densidades máximas que alcanzan los distintos aislados en cultivo son bastante similares, resultando ligeramente superiores para los aislados D3 y D10, y un poco ligeramente inferiores para el aislado D4.

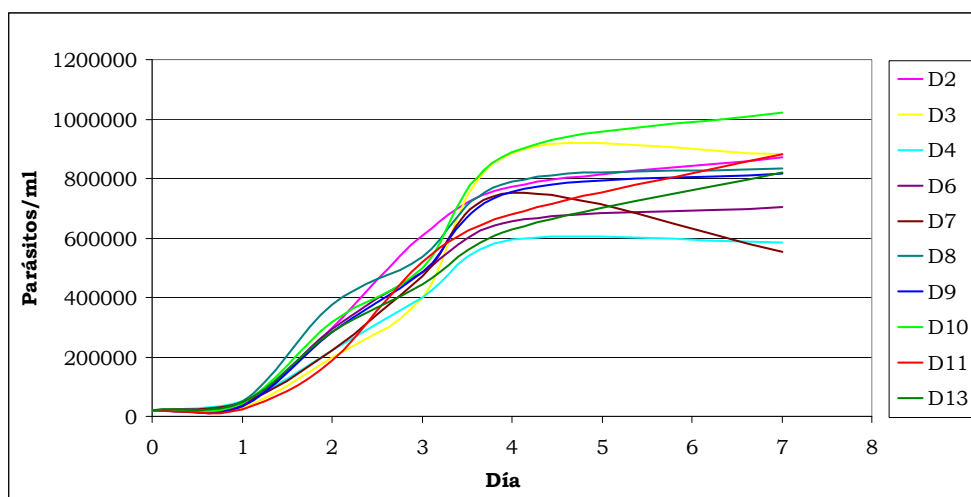


Figura 53. Cinéticas de crecimiento de los diferentes aislados de *Philasterides dicentrarchi* en medio L-15 completo suplementado con 10% FBSi y solución PSA. Los datos son los valores medios de tres réplicas paralelas de cada aislado, y su desviación estándar fue en todos los casos menor del 10%.

Las cinéticas de crecimiento de los diez aislados fueron modelizadas siguiendo un modelo aditivo generalizado (GAM) ajustado a una distribución de Poisson. Los modelos de crecimiento obtenidos ($p < 0,05$) se muestran en la figura 54, en la que se han agrupado los 10 aislados en 3 grupos según la forma de su curva de crecimiento. El primer grupo comprende los aislados D2, D6, D8 y D9, el segundo grupo los aislados D3 y D10, y el tercero los aislados D4, D7, D11 y D13, de los cuales los dos primeros difieren ligeramente de los demás del grupo.

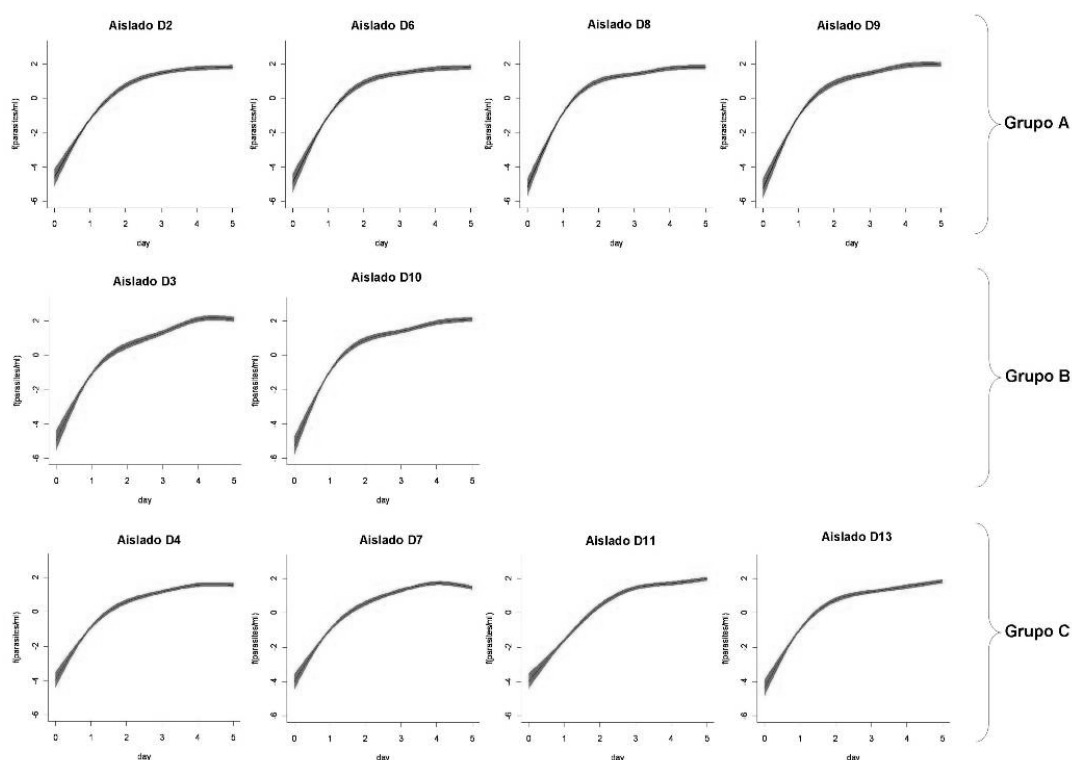


Figura 54. Modelización de las cinéticas de crecimiento de los diferentes aislados de *Philasterides dicentrachi* durante 5 días de cultivo en medio L-15 completo suplementado con 10% FBSi y 1% de solución PSA, siguiendo un modelo aditivo generalizado ajustado a una distribución de Poisson ($p < 0,05$).

Análisis genético de los aislados

Para el análisis genético, se amplificó un fragmento de 390 pb del gen de la β -tubulina y fue posteriormente secuenciado. El alineamiento de estas secuencias nucleotídicas, obtenido mediante el programa Clustal Walls v 2.0.12, se muestra en la figura 55, en la que podemos observar diferencias en dos nucleótidos: los aislados D11 y D13 poseen una timina en la posición 149, en lugar de la adenosina que poseen el resto de los aislados, y los aislados D3, D4, D9 y D10 poseen una timina en la posición 239, en lugar de la citidina que poseen los demás.

En base a las secuencias nucleotídicas de los amplicones del gen de la β -tubulina se construyó un árbol filogenético, en el que los 10 aislados se agrupan en 3 genotipos (Fig. 56): uno que comprende los aislados D2, D6, D7 y D8 y que hemos denominado “genotipo D2”, otro con los aislados D3, D4, D9 y D10 que hemos denominado “genotipo D3” un último grupo con los aislados D11 y D13, que hemos denominado “genotipo D11”.

```

D10      TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D9       TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D4       TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D3       TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D8       TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D7       TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D6       TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D2       TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D11      TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
D13      TACTGGAGGAAGATATGTCCCGAGGCCATCCTTATGGATTGGAAACCCGGTACCATGGA 60
*****

D10      TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D9       TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D4       TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D3       TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D8       TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D7       TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D6       TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D2       TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D11      TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
D13      TTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCCGGACAACCTCTTCAGACCTGATAACTTGAATAATTAAAT 120
*****

D10      AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D9       AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D4       AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D3       AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D8       AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D7       AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D6       AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D2       AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D11      AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
D13      AAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAGAAAGAATGTAAATAAAATTAATAAT 180
*****

D10      TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D9       TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D4       TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D3       TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D8       TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D7       TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D6       TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D2       TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D11      TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
D13      TAAATAGCGTTTTCCGGATAAACCGGAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTG 240
*****

D10      AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D9       AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D4       AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D3       AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D8       AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D7       AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D6       AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D2       AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D11      AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
D13      AAGGAGCTGAATTAATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTG 300
*****

```

Figura 55. Alineamientos de las secuencias de la β -tubulina de los 10 aislados de *Philasterides dicentrarchi*, obtenidos con el programa ClustalW v 2.0.12. Los cuadros marcan las diferencias.

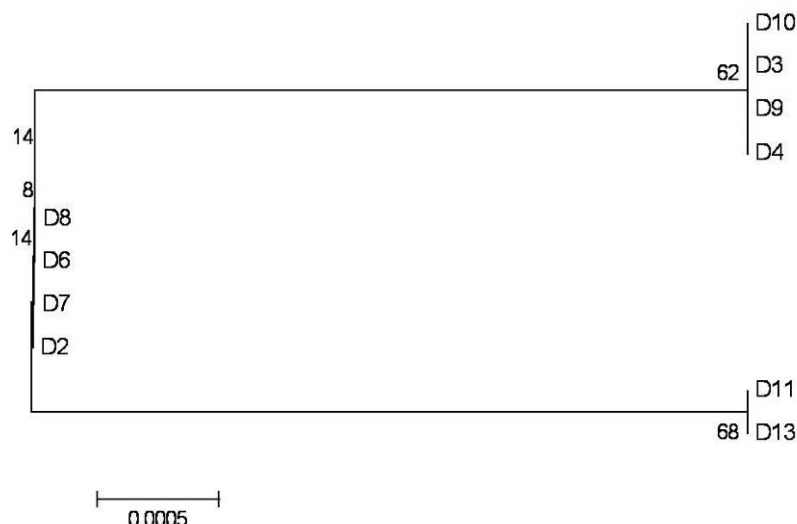


Figura 56. Árbol filogenético NJ de las relaciones entre los aislados de *P. dicentrarchi* inferidas a partir de las secuencias de la β -tubulina. Los números en los nodos representan los valores de *bootstrap* de 1000 valores pseudomuestreados.

Análisis serológico de los aislados

Se analizaron los distintos aislados mediante Western blot. La figura 57 muestra un Western blot representativo obtenido bajo condiciones reductoras (Fig 57A,B) y no reductoras (Fig 57C,D), enfrentando antígenos procedentes de los extractos totales de los aislados de *P. dicentrarchi* con antisueros de ratón anti-D2 (Fig. 57A,C) y anti-D3 (Fig. 57B,D). Los serotipos han sido determinados teniendo en cuenta la ausencia o presencia de ciertas bandas mayoritarias marcadas específicamente por cada uno de los dos anticuerpos, y sin tener en cuenta las bandas con reactividad cruzada. Inicialmente se observan tres patrones mayoritarios de inmunorreconocimiento:

- (a) Uno que comprende el aislados D2 y los aislados D6, D7 y D8, denominado “serotipo D2/D6”, que posee un patrón de reconocimiento antigénico caracterizado por la presencia de una banda mayoritaria de alrededor de 37 kDa bajo condiciones reductoras (Fig 57A, recuadro rojo) o de 50 kDa bajo condiciones no reductoras (Fig. 57C, recuadro rojo). Aunque el serotipo D2 comparte la banda mayoritaria que caracteriza al serotipo, carece de otras bandas presentes en el serotipo D6 (Fig. 57A,C, flechas), que incluye los aislados D6, D7 y D8, los cuales presentan un patrón antigénico idéntico.
- (b) Un segundo serotipo que incluye los aislados D3, D4, D9 y D10, denominado “serotipo D3”, caracterizado por la presencia de una banda ancha mayoritaria de alrededor de 32-26 kDa bajo condiciones reductoras (Fig. 57B, recuadro verde) o de alrededor de 38-45 kDa bajo condiciones no reductoras (Fig. 57D, recuadro verde).
- (c) Un último patrón de inmunorreconocimiento que comprende los aislados D11 y D13, llamado “serotipo D11”, caracterizado por tener varias bandas entre los 39-48 kDa bajo condiciones reductoras (Fig. 57B, recuadro azul) o entre los 30-32 kDa bajo condiciones no reductoras (Fig. 57D, recuadro verde).

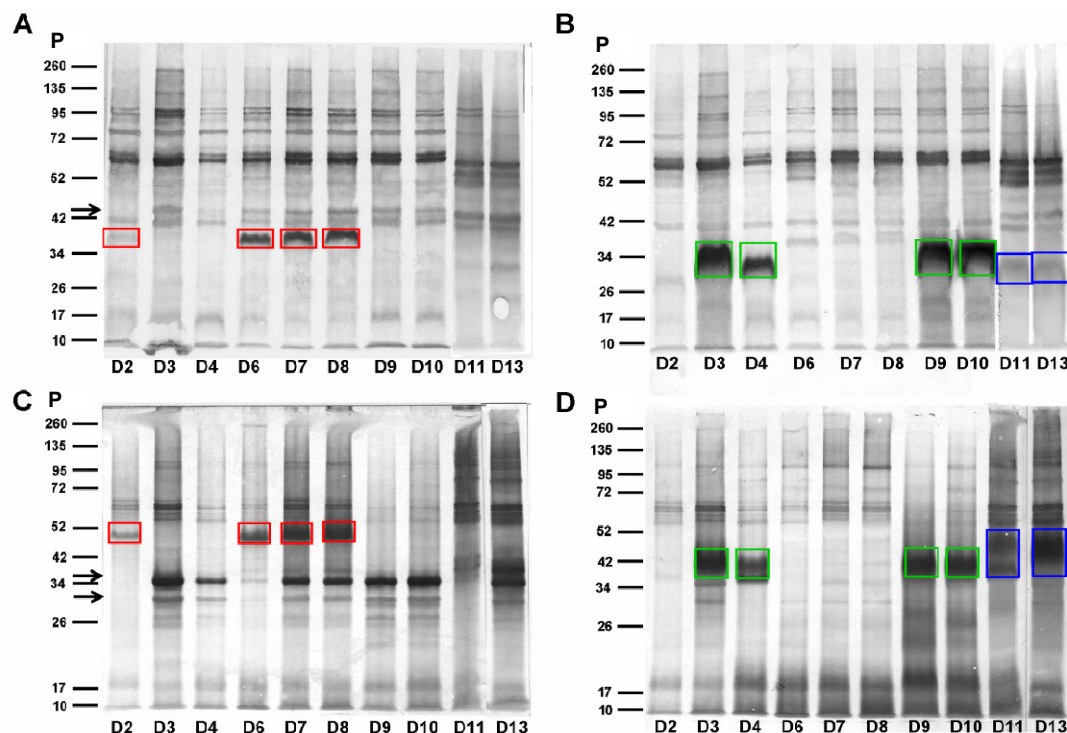


Figura 57. Patrones de reconocimiento antigénico de los aislados de *P. dicentrarchi* obtenidos a partir de los muestreos de los años 2007 y 2009, generados por el suero de ratones inmunizados con los aislados D2 (A, C) o D3 (B, D), determinados por Western blot bajo condiciones reductoras (A, B) o no reductoras (C,D). Las cajas indican las bandas que caracterizan los serotipos D2/D6 (rojo), D3 (verde) y D11 (azul). Las flechas indican las bandas que distinguen los subgrupos en el serotipo D2/D6. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

La piscifactoría incorpora alevines de distintos orígenes (indicados como lotes en la Tabla 11), y uno de estos lotes (Lote II) fue monitorizado a lo largo de varios meses para determinar si existe alguna relación entre el lote de origen de los peces y el serotipo presente en la infección. Así, tras la extracción de los extractos totales de cada uno de ellos, se llevó a cabo un Western blot (Fig. 58), que reveló que los aislados obtenidos en Abril y Mayo pertenecen al serotipo D2/D6, mientras que el aislado obtenido en Julio pertenece al serotipo D3 o D11, lo que indica que al menos dos serotipos están presentes en el mismo sistema y la presencia de uno u otro serotipo no parece estar relacionada con el lote de procedencia de los peces (Fig. 58).

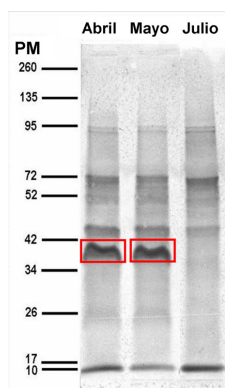


Figura 58. Patrones de reconocimiento antigénico generados por sueros de ratón anti-D2, determinados por Western blot bajo condiciones reductoras. Los tres aislados se obtuvieron de peces de un mismo lote de origen (Lote II) muestreados en Abril, Mayo y Julio del año 2009. La caja muestra la banda característica del serotipo D2/D6. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

También nos preguntamos si más de un serotipo podría participar en el mismo brote de escuticociliatosis. Para responder esta cuestión, se analizaron los cerebros de 25 peces de un mismo tanque (sistema B; Fig.50), durante un brote de escuticociliatosis. De este muestreo, se obtuvieron 19 aislados y, tras obtener los extractos totales, éstos se separaron en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras y no reductoras que fueron teñidos con azul Coomassie para estudiar el patrón polipeptídico o transferidos a membranas de PVDF para estudiar el patrón de reconocimiento antigénico mediante Western blot.

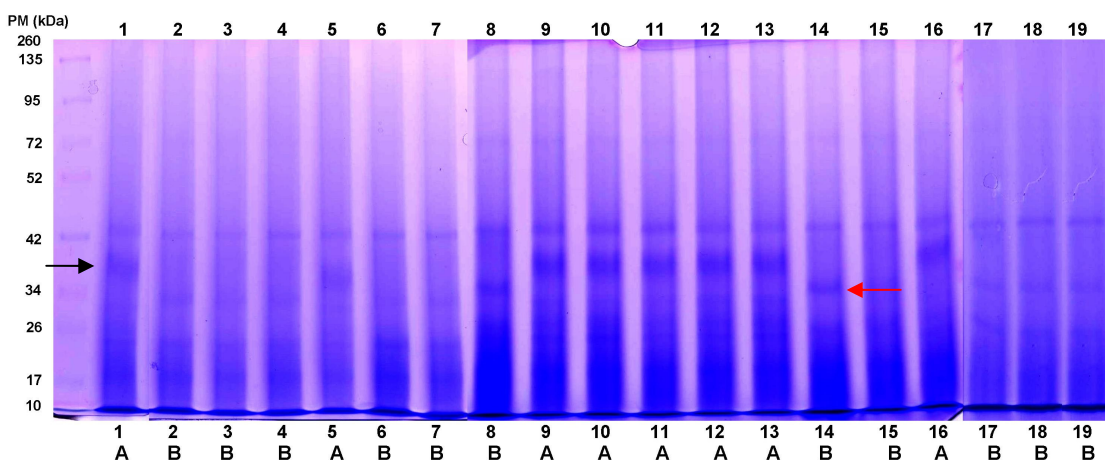


Figura 59. Patrón polipeptídico obtenido por SDS-Page bajo condiciones no reductoras de los lisados de los aislados de *Philasterides dicentrarchi* obtenidos en el muestreo realizado durante el último brote de escuticociliatosis que afectó al sistema B de la piscifactoría. Las flechas indican las bandas que diferencian los dos patrones (A y B), PM: marcadores de peso molecular en kDa.

A la vista de los patrones polipeptídicos de los aislados, obtenidos mediante SDS-PAGE (Fig. 59), se observan dos tipos de patrones: el patrón A, que presenta una banda de 38 kDa (flecha negra), y el patrón B, que presenta una banda de 32 kDa en lugar de la de 38 kDa (flecha roja).

En el Western blot de estos mismos antígenos, frente al suero de ratón anti-D3 (Fig. 60B), en el que se pueden observar dos patrones antigénicos en los 19 aislados: el patrón llamado A (46%), perteneciente al serotipo D3, y caracterizado por una banda ancha de 38-45 kDa, y el patrón llamado B (54%), perteneciente al serotipo D11 y caracterizado por poseer dos bandas entre 39-48 kDa, lo que indica que al menos dos serotipos coexisten en un mismo tanque y están implicados en la misma infección. Aparentemente, el serotipo D2/D6 no está presente en este sistema de circulación o no está participando en la infección, ya que ninguno de los 19 aislados muestra la banda característica de 50 kDa que caracteriza a este serotipo (Fig. 60A). Los patrones polipeptídicos obtenidos mediante SDS-PAGE se corresponden con los del Western blot frente al suero anti-D3 (Figs. 59,60).

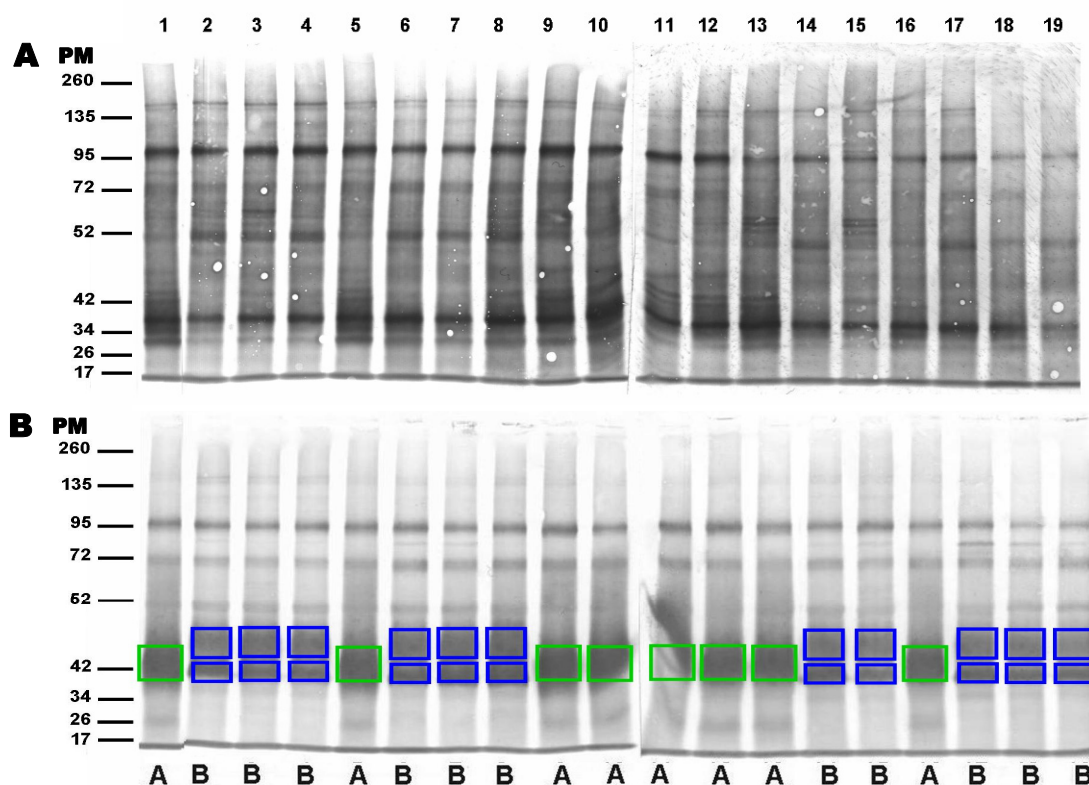


Figura 60. Patrones de reconocimiento antigénico generados por sueros de ratones inmunizados con el aislado D2 (A) o D3 (B), determinados por Western blot bajo condiciones no reductoras. Los aislados de *P. dicentrarchi* se obtuvieron en el muestreo realizado durante el último brote de escuticociliatosis en el sistema B de la piscifactoría. Para cada carril, los números identifican al aislado y las letras mayúsculas lo asignan a uno de los dos patrones serológicos encontrados (A, que corresponde al serotipo D3 con cajas verdes, o B, que corresponde al serotipo D11 con cajas azules). PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

Se obtuvieron sueros de rodaballos supervivientes a esta infección, y se realizó un Western blot frente a los antígenos de los 10 aislados obtenidos a partir de los muestreos (Fig. 61). El reconocimiento antigénico generado por estos sueros de rodaballo es bastante escaso en el Western blot bajo condiciones no reductoras, en el que prácticamente no se observan diferencias entre los 10 aislados (Fig. 61A), aumentando el número de bandas reconocidas en el Western blot bajo condiciones reductoras (Fig. 61B), donde se pueden observar varias diferencias entre los aislados.

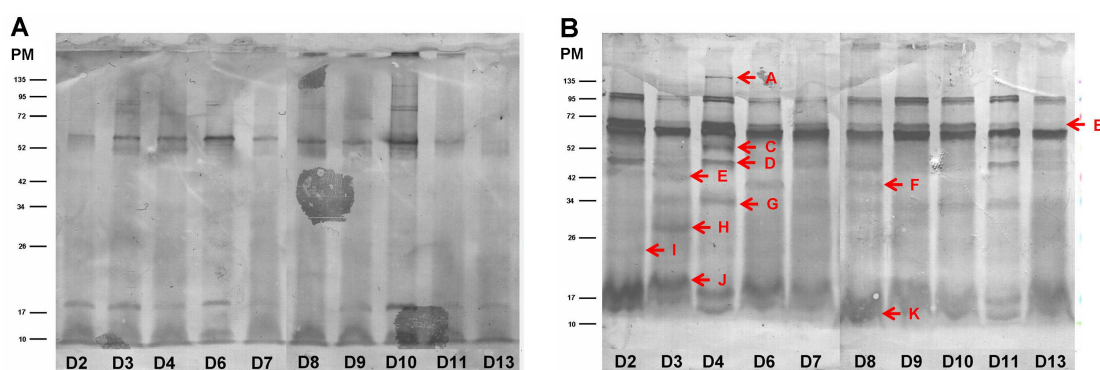


Figura 61. Patrones de reconocimiento antigénico de los aislados de *P. dicentrarchi* obtenidos a lo largo de los muestreos mensuales durante el año 2009, generados por un pool de 10 sueros de rodaballos supervivientes a un brote de escuticociliatosis, y determinados mediante Western blot bajo condiciones no reductoras (A) y reductoras (B). PM: marcadores moleculares en kilodaltons.

Las diferencias observadas en el reconocimiento antigénico del suero de rodaballo no coinciden con las observadas con los sueros de ratón. Por otro lado, en el western a partir del suero de rodaballo el reconocimiento de las bandas es confuso debido a lo difusas que aparecen algunas de las bandas.

Ensayo de protección cruzada

Por problemas de disponibilidad de tiempo y espacio, no fue posible realizar todas las combinaciones entre los 3 serotipos, y los ensayos de protección cruzada se realizaron con los aislados D2 y D3 (Fig. 62). El aislado D3 causó un 100% de mortalidad en peces no vacunados, un 72 % en peces vacunados con D2 y un 15% de mortalidad en peces vacunados con el antígeno homólogo, lo que sugiere que la vacunación con el aislado D2 ofrece poca protección frente al aislado D3.

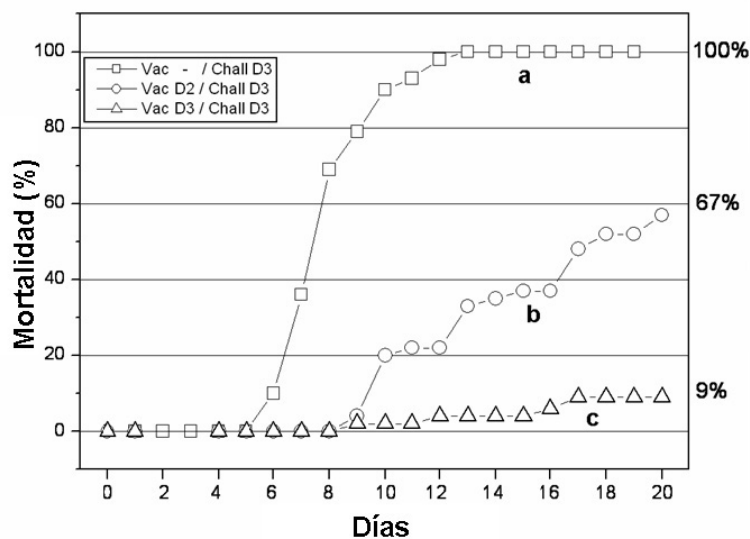


Figura 62. Mortalidad acumulada obtenida a partir del reto experimental en rodaballo. Los peces fueron vacunados (Vac) con los aislados D2 o D3, o con PBS. Pasado un mes tras la segunda vacunación, los peces se retaron (Chall) con el aislado D3 (5×10^5 parásitos/pez). Se muestran los porcentajes de mortalidad acumulada pasados 20 días desde el reto. Los valores indicados por diferentes letras (a-b-c) difieren significativamente.

Determinación de los niveles de anticuerpos en el suero

Tras el brote de escuticociliatosis mencionado en una sección anterior, se analizó mediante ELISA el suero de rodaballos supervivientes para determinar los niveles de anticuerpos frente a los tres serotipos de *P. dicentrarchi* (Fig. 63). Aunque la respuesta parece ser mayor para los serotipos D3 y D11, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

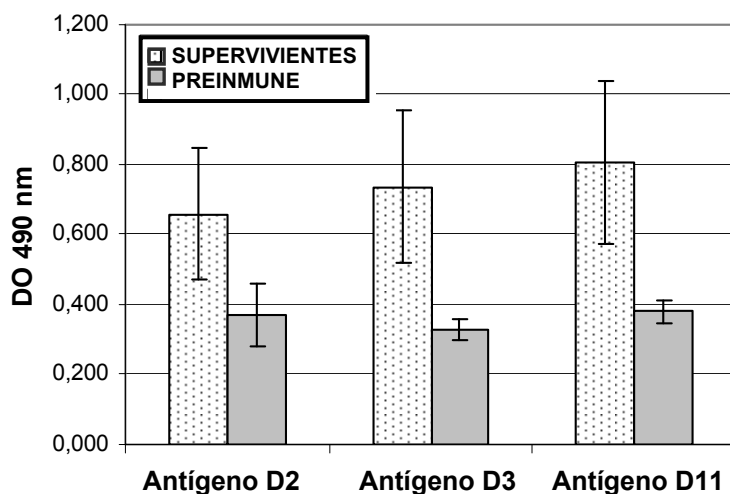


Figura 63. Niveles de anticuerpos, determinados por ELISA, generados por sueros de rodaballos que sobrevivieron al brote de escuticociliatosis en el sistema B de la piscifactoría, frente a los antígenos pertenecientes a los tres serotipos de *P. dicentrarchi* que existen actualmente en la granja. En el ELISA se incluyeron también sueros preinmunes de rodaballo. Los resultados se expresan como unidades de absorbancia a 492 nm y los valores mostrados son la media \pm desviación estándar de sueros de 10 rodaballos supervivientes y sueros de 3 rodaballos sanos.

Ensayo de competencia

Para la realización de este ensayo, el mismo número de ciliados de dos aislados diferentes se sembraron en frascos de cultivo con L15 completo suplementado con un 10% de FBSi y solución PSA y, una vez que los cultivos mostraron síntomas de falta de alimento, se recogieron los ciliados de cada frasco, se lisaron y se analizaron los patrones antigénicos mediante Western blot para determinar los serotipos presentes en el cultivo.

En la observación diaria de los cultivos al microscopio óptico, no se observaron procesos de conjugación en ninguno de los frascos. Para la realización de este ensayo se han incluido: los antígenos independientes de los aislados, una mezcla de antígenos que resulta de la mezcla de los antígenos de los dos aislados en proporción 1:1 (v:v) y antígenos procedentes de los cultivos mixtos de los dos aislados. Para una mejor interpretación de los resultados, los patrones antigénicos se analizaron con los dos anticuerpos obtenidos en ratón, anti-D2 (Fig. 64A) y anti-D3 (Fig. 64B). El anticuerpo anti-D2 discrimina claramente entre el serotipo D2/D6 y el anticuerpo anti-D3, sin embargo, discrimina entre los serotipos D3 y D11, pero no reconoce las bandas que caracterizan al serotipo D2/D6.

Con respecto al par (D2/D3), con el suero anti-D2, el aislado D2 muestra una banda de 50 kDa, y con el suero anti-D3 el aislado D3 muestra una banda ancha de 38-45 kDa, y estas tres bandas están presentes en los patrones de la mezcla y la competencia, indicando que ambos aislados están presentes (Fig. 64A). Para el par D2/D11, el suero anti-D2 detecta claramente la banda del serotipo D2/D6 (Fig. 64A) mientras que el suero anti-D3 detecta claramente las dos bandas de 39-48 kDa del serotipo D11, y se observa un patrón similar tanto en la mezcla antigénica como en la competencia (Fig. 64A,B). Finalmente, en el análisis del par D3/D11, los dos aislados están presentes en el patrón de la competencia, especialmente cuando se utiliza el suero anti-D3 (Fig. 64B), y el patrón obtenido tras la mezcla de antígenos es similar al patrón de la competencia (Fig. 64B).

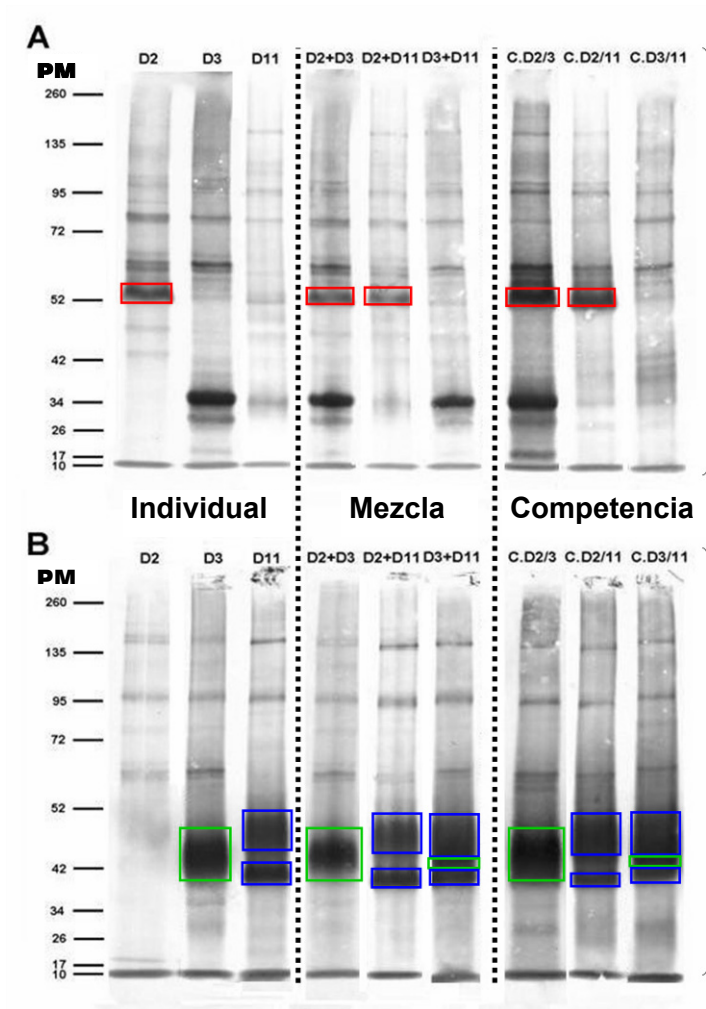


Figura 64. Patrones serológicos obtenidos del ensayo de competencia frente al suero anti-D2 (A) y el suero anti-D3 (B). Para cada uno de los tres ensayos de competencia se muestran: los patrones serológicos de los dos aislados individuales, el patrón derivado de la mezcla de los antígenos de los dos aislados individuales en proporción 1:1, y el patrón serológico obtenido en el ensayo de competencia entre los aislados pareados. Las cajas muestran las bandas utilizadas para determinar los serotipos existentes, y se refieren al serotipo D2/D6 (rojo), serotipo D3 (verde) y serotipo D11 (azul). PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

Susceptibilidad a quimioterápicos

La supervivencia de los diferentes aislados ante concentraciones crecientes de formalina y peróxido de hidrógeno fue testada a las 24 horas de tratamiento. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la IC₅₀ y la MLD (Tabla 13).

	Formalina (IC50/MLD)	Peróxido de hidrógeno (IC50/MLD)
<i>D2</i>	20,80 / 35	12,88 / 30
<i>D3</i>	20,46 / 30	7,83 / 15
<i>D4</i>	14,36 / 30	6,47 / 20
<i>D6</i>	14,55 / 35	7,09 / 15
<i>D7</i>	15,16 / 40	8,99 / 35
<i>D8</i>	15,47 / 27,5	2,77 / 15
<i>D9</i>	17,59 / 35	7,20 / 15
<i>D10</i>	11,00 / 30	7,70 / 10
<i>D11</i>	12,37 / 30	7,83 / 15
<i>D13</i>	13,25 / 27,5	4,12 / 15

Tabla 13. Supervivencia a las 24 horas frente a los tratamientos con formalina (37%) y peróxido de hidrógeno (49,5%), en agua de mar. Los datos (en ppm del producto comercial) representan dos tipos de índices: el IC50, que representa la concentración del inhibidor que provoca una reducción de la supervivencia del 50%, y la MLD (mínima dosis letal), que representa la concentración mínima a la que ya no existe ningún parásito vivo (no hay movimiento ciliar).

Las cinéticas de crecimiento a las 24 horas ante distintas concentraciones de los dos quimioterápicos se han modelizado utilizando modelos aditivos generalizados (GAM) ajustados a una distribución de Poisson (Fig. 65). En las cinéticas de crecimiento se han encontrado diferencias significativas, y su análisis nos permite agrupar a los aislados en 4 grupos en el caso de la formalina (uno que incluye a los aislados D2, D3 y D9; otro con los aislados D4, D6, D8 y D13; otro con los aislados D10 y D11; y el aislado D7, con una cinética algo diferente de todas las demás) y en 3 grupos en el caso del peróxido de hidrógeno (un grupo con los aislados D2 y D13, otro con los aislados D4 y D8, y otro grupo con todos los aislados restantes).

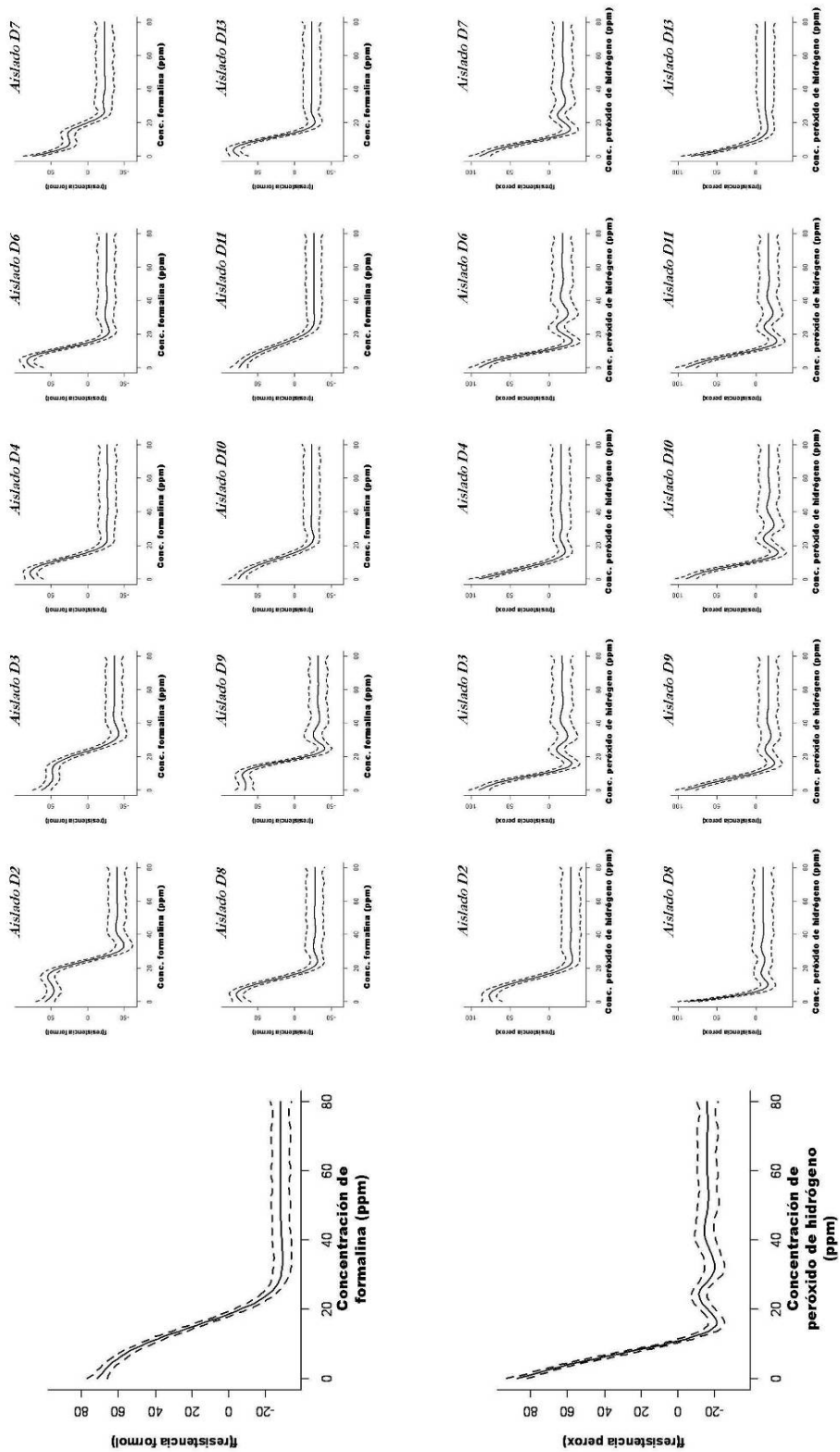


Figura 65. Modelización de las cinéticas de crecimiento ante distintas concentraciones de formalina (A) y peróxido de hidrógeno (B) de los diferentes aislados de *Philasterides dicentrarchi* en agua de mar, siguiendo un modelo aditivo generalizado ajustado a una distribución de Poisson ($p < 0,05$). Para cada uno de los quimioterápicos, la gráfica de mayor tamaño representa el modelo general de crecimiento, obtenido a partir de las cinéticas de los diferentes aislados, y las gráficas de menor tamaño representan las cinéticas de crecimiento de los aislados independientes.

DISCUSIÓN

La variabilidad genética en parásitos es un fenómeno relativamente común que ocurre en el contexto de las interacciones ecológicas con el hospedador (Thompson y Lymbery, 1996; Thomas *et al.*, 2011). Esta variabilidad genética está claramente implicada en el desarrollo de la infección parasitaria y en la interacción de las funciones inmunitarias del hospedador (Manoel-Caetano y Silva, 2007). Por tanto, el estudio de la variación genética en parásitos tiene una enorme relevancia para el desarrollo de vacunas y estrategias de vacunación (Windon, 1996).

En estudios previos hemos demostrado la existencia de varias cepas de *P. dicentrarchi* en las piscifactorías gallegas de rodaballo (Budiño *et al.*, 2011). No estaba claro, sin embargo, si existía también variación intraespecífica dentro de cada piscifactoría. En el presente estudio, se ha intentado determinar con mayor precisión la variación intraespecífica entre los aislados de *P. dicentrarchi* obtenidos de una piscifactoría con RAS, llevando a cabo análisis morfométricos, serológicos, genéticos y de susceptibilidad a desinfectantes.

En la caracterización morfológica de los diez aislados de *P. dicentrarchi* nos hemos centrado principalmente en la ciliatura oral, como ya se ha descrito en estudios previos (Iglesias *et al.*, 2001; Budiño *et al.*, 2011). El análisis morfológico separa a los aislados en 4 morfotipos básicos: D2, D3, D6 y D11. El aislado D2 aparece separado del resto y los aislados D3, D11 y D6 no presentan regiones comunes, mientras que el resto de los aislados muestran características intermedias y las elipses obtenidas se solapan con las otras, lo que no hace posible separar claramente todos los aislados en grupos de acuerdo a las características morfológicas. Estos resultados sugieren que el análisis morfológico puede ayudar, pero no puede ser considerado en solitario para discriminar entre diferentes cepas de *P. dicentrarchi* por ser demasiado ambiguo, algo ya puesto de manifiesto por otros autores en esta y otras especies de ciliados (Jung *et al.*, 2007; Wiacowski *et al.*, 1999).

Analizamos también las cinéticas de crecimiento de los aislados. Según las curvas de crecimiento obtenidas es posible formar tres grupos de ciliados, aunque los grupos que se obtienen no coinciden con los obtenidos en los otros análisis.

El estudio serológico se realizó utilizando sueros anti-ciliado obtenidos en rodaballo y en ratón. Mientras que los sueros de rodaballo mostraron una limitada capacidad de reconocimiento de los antígenos del ciliado, los sueros de ratón mostraron un reconocimiento mucho mayor, dando como resultado distintos patrones de reconocimiento antigénico, que han sido utilizados para agrupar los ciliados en serotipos. La limitada capacidad de discriminación antigénica que presentan los sueros de rodaballo ya había sido puesta de manifiesto en trabajos anteriores (Leiro *et al.*, 1994; Piazzon *et al.*, 2008).

A nivel inmunoquímico, el Western blot llevado a cabo con los antígenos de los diez aislados resultó en varios patrones de reconocimiento antigénico, que han sido utilizados para determinar cuantos serotipos existen en los aislados obtenidos. Los dos anticuerpos utilizados en este estudio (anti-D2 y anti-D3) mostraron diferentes patrones de reconocimiento antigénico entre los aislados. El anticuerpo anti-D2 discrimina bien entre el serotipo D2/D6 y los serotipos D3-D11, mientras que para discriminar entre los serotipos D3 y D11 es necesario recurrir al anticuerpo anti-D3, lo que hace necesaria la utilización conjunta de los dos anticuerpos para un análisis completo de los patrones serológicos. Tras el análisis serológico de los 10 aislados de *P. dicentrarchi* obtenidos en la piscifactoría, hemos agrupado a todos los aislados dentro de 3 serotipos (D2/D6, D3 y D11), cuyos agrupamientos coinciden casi exactamente con los genotipos obtenidos a partir del análisis genético utilizando el gen de la β -tubulina que, como hemos visto previamente, es un buen marcador para detectar nuevas cepas de estos escuticociliados (Budiño *et al.*, 2011).

En el análisis genético hemos comparado un fragmento de 300 pb del gen de la beta-tubulina, un gen que ha sido usado para clarificar posiciones filogenéticas en ciliados (Fast *et al.*, 2002; Nishi *et al.*, 2005; Robinson y Katz, 2007). El análisis de esa secuencia de 300 pb ha permitido formar tres grupos de

ciliados, los cuales se diferencian entre sí en un nucleótido. Según este análisis, D2, D6, D7 y D8 estarían en un grupo; D3, D4, D9 y D10 estarían en un segundo grupo y, finalmente, D11 y D13 en un tercer grupo. Como veremos a continuación, estos datos coinciden bastante bien con el estudio serológico, con algunas discrepancias en el grupo de D2, que posiblemente se podrían solventar comparando la secuencia de otros genes o incluso comparando un fragmento más grande de este gen.

A partir del análisis serológico de los aislados obtenidos de un brote reciente de escuticociliatosis en uno de los sistemas de la piscifactoría, pudimos comprobar que la infección estuvo producida por los serotipos D3 y D11. No hemos encontrado patrones serológicos mezclados en ninguno de los aislados obtenidos, sugiriendo que cada pez infectado contiene ciliados pertenecientes a un solo serotipo. Sin embargo, como ambos serotipos están en el agua, no podemos descartar que algunos peces pudieran estar infectados por ciliados de ambos serotipos. El ELISA mostró que el suero de los peces supervivientes a la infección no distingue entre serotipos, y una posible explicación podría ser que todos los serotipos comparten un amplio grupo de antígenos que son reconocidos por el suero, lo que no hace posible la distinción entre serotipos mediante este método.

Estudios previos han demostrado que los peces con anticuerpos específicos en el suero frente a un aislado son resistentes al mismo (Piazzon, 2010; Leiro *et al.*, 2008; Piazzon *et al.*, 2011). A falta de estudios de protección con todos los serotipos, es posible que los peces que hayan sobrevivido a una infección con un determinado serotipo sean resistentes a ese serotipo por un tiempo, debido a la presencia de anticuerpos específicos, pero no lo sean frente a otros serotipos. Si bien no se han realizado estudios de protección que incluyan al serotipo D11, podemos afirmar que no existe protección cruzada entre los serotipos D2 y D3, lo que permitiría la posibilidad de que los serotipos se fueran alternando en las infecciones.

De acuerdo con los resultados obtenidos, parece que en la misma piscifactoría coexisten tres serotipos de *P. dicentrarchi*. No hemos detectado aislados con patrones serológicos intermedios, lo que sugiere que los procesos de conjugación no han sucedido o fueron muy escasos. El proceso de conjugación está propiciado, entre otros, por la falta de alimento y la alta densidad de ciliados (Siegel, 1956; Phadke y Zuffall, 2009), condiciones que no suelen darse en la piscifactoría. Lucchesi y Santangelo (2004), tras una serie de muestreos realizados en el medio marino, encontraron sólo un 0,07% de conjugantes en el total de ciliados recolectados, concluyendo que la conjugación en el medio natural, menos frecuente de lo que previamente se pensaba, es un fenómeno sexual errático, hecho puesto ya de manifiesto en otros trabajos (Fleckerton, 2002). Esta tasa de conjugación probablemente no es lo suficientemente elevada como para ser detectada en las muestras de peces infectados a menos que posean importantes ventajas en términos de virulencia con respecto a los no conjugantes.

Los ciliados que pertenecen al mismo clon pueden expresar varios antígenos de superficie (i-antígenos), y cuando cambian las condiciones de cultivo o se utilizan algunos tratamientos se produce la transformación del serotipo de la célula (Sommerville, 1970). Estas alteraciones no están causadas por mutaciones genéticas, parecen ser reversibles y generalmente implican a la mayoría de las células del clon. El sistema de genes del serotipo opera bajo el principio de “exclusión mutua”: de cada vez, sólo un i-antígeno es detectable en la superficie de la célula de todos los antígenos genotípicamente disponibles (Yudin y Uspenskaya, 2002), y casos excepcionales en los cuales dos o más i-antígenos aparecen simultáneamente en la superficie celular son raros. Considerando estas asunciones, los resultados del presente estudio sugieren que las diferencias en los patrones serológicos no se deben a cambios en las condiciones de cultivo del ciliado. Las diferencias morfológicas observadas entre los aislados, y el hecho de que pertenecen a diferentes genotipos avalan la hipótesis de que estamos ante diferentes cepas del ciliados, y no ante distintas variantes antigénicas de un solo aislado.

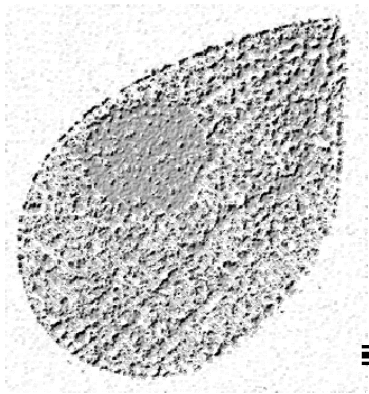
Thompson (1988) propuso que el término “cepa” debería usarse para referirse a variantes dentro de una especie del parásito que han sido caracterizadas por tantos criterios como sea posible. De acuerdo con esta definición, podríamos afirmar que en la piscifactoría coexisten al menos 3 cepas del ciliado *P. dicentrarchi*. Los resultados obtenidos también sugieren que los serotipos D2 y D3 aparecieron en la piscifactoría hace tiempo y el serotipo D11, por otra parte, parece ser una incorporación reciente a la piscifactoría, probablemente asociada a la entrada de juveniles.

Parece claro que las piscifactorías que incorporan alevines de distinta procedencia favorecen la incorporación de distintas cepas de *P. dicentrarchi* a la planta de cultivo. El sistema de recirculación de agua, por otra parte, posibilita además que los ciliados no se eliminen y alcancen una mayor densidad en el sistema, especialmente si la renovación del agua no es muy elevada. Seguramente, sería necesario tener una alta renovación del agua conjuntamente con un sistema de tratamiento de la misma para disminuir la carga de parásitos en los tanques. Si bien los tratamientos con formol y peróxido de hidrógeno no son apropiados dada la naturaleza endógena del parásito, sí que podrían ser utilizados para eliminar las formas libres del parásito (Iglesias *et al.*, 2002), disminuyendo así la presión infectiva sobre los peces; no obstante, es de esperar que en un corto espacio de tiempo tras la administración de los desinfectantes se vuelvan a alcanzar las mismas densidades que antes de aplicar los tratamientos.

Un reciente estudio en varios clones de un ciliado oligotrico sugiere que la variación intraespecífica es baja a nivel genético (0-4%), moderada a nivel morfológico (5-15%) y elevada a nivel ecofisiológico (10-100%) (Weisse *et al.*, 2008). La variabilidad obtenida tras todas las pruebas realizadas con los aislados coincide con estos porcentajes, y la conclusión que obtenemos es que los ensayos ecofisiológicos, como los de crecimiento o susceptibilidad a desinfectantes, no son de utilidad para caracterizar cepas del ciliado, debido a la elevada variabilidad entre clones, y la caracterización morfológica también resultó demasiado variable como para obtener resultados concluyentes,

mientras que los estudios serológicos y genéticos se revelan como los más útiles para la caracterización de estas cepas.

La existencia de cepas antigénicamente diferentes de *P. dicentrarchi* ha sido ampliamente demostrada en estudios realizados en rodaballo (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004b; Piazzon *et al.*, 2008; Budiño *et al.*, 2011) y lenguado japonés (Jung *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009b). Estudios previos han demostrado que una vacuna con ciliados fijados en formalina en un adyuvante oleoso es capaz de inducir un elevado grado de protección en rodaballo frente al aislado utilizado en la vacuna (Sanmartín *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008). Otros autores han desarrollado una vacuna con una mezcla de tres aislados distintos de este ciliado, la cual produce un cierto grado de protección frente a uno de estos aislados del parásito (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta la fecha no hay evidencia de la existencia de una vacuna que proteja frente a cualquier aislado de este parásito. Los resultados del presente estudio también muestran que, antes de utilizar una vacuna en una piscifactoría particular, es necesario determinar el número de cepas de *P. dicentrarchi* que están causando las infecciones, y averiguar si inducen protección cruzada. Para este caso particular, las autovacunas generadas deberían contener ciliados de más de un serotipo.



DISCUSIÓN GENERAL

En resumen, en este trabajo se han caracterizado siete aislados de *Philasterides dicentrarchi* de diferentes orígenes geográficos utilizando varios tipos de análisis, con el fin de determinar el más rápido y eficaz para conseguirlo.

Dado que el objetivo futuro de este trabajo sería la consecución de una vacuna que proteja frente a cualquier aislado de este ciliado, los análisis serológicos y de protección han sido los métodos centrales que se han utilizado para validar la efectividad de los otros métodos ensayados. Con respecto a los análisis serológicos, los sueros B1, C1 y D2 mostraron unas características de reconocimiento antigénico comunes, y los sueros D3, I1, P1 y S1 también tienen un reconocimiento similar. Además, ambos grupos muestran bandas comunes en sus antígenos. Los ensayos de protección nos indican que existen dos grupos (uno con los aislados B1, C1 y D2 y otro con los aislados I1 y D3) entre los cuales la protección cruzada es muy baja, y que muestran una protección cruzada aceptable entre los aislados que los forman. Los agrupamientos obtenidos de estos dos análisis coinciden, y demuestran la utilidad de los análisis serológicos en la caracterización de cepas.

Los análisis morfológicos muestran que los siete aislados se distribuyen en cuatro grupos bien diferenciados: uno que agrupa a los aislados B1, C1, I1 y P1, otro que incluye al aislado D2, otro con el aislado D3, y un último grupo formado por el aislado S1, que muestra características morfológicas propias de los otros tres grupos. Los análisis ecofisiológicos no permiten extraer agrupamientos claros, e indican una elevada variabilidad en cuanto a crecimiento y resistencia a compuestos químicos. Cada aislado presenta una cinética de crecimiento característica, siendo los aislados D3 y P1 los de mayor tasa de crecimiento, frente al aislado S1, con la tasa menor. Los aislados también muestran una diferente capacidad de conjugación, que es mayor en el caso de los aislados D3, S1 e I1, y muy baja para los aislados B1, P1, C1 y D2. La resistencia de los aislados frente al tratamiento con formalina y resveratrol fue similar, mientras que ante el peróxido de hidrógeno la resistencia fue muy variable, siendo los aislados B1, C1 y D2 los más resistentes.

Las diferencias entre los grupos de aislados obtenidos tras la caracterización morfológica y ecofisiológica podrían fácilmente ser resultado de adaptaciones ambientales de los parásitos, y posiblemente no tengan relevancia en cuanto a la inmunogenicidad de los aislados. Los resultados de ambos tipos de análisis, morfológicos y ecofisiológicos, no coinciden con los datos obtenidos en los ensayos de protección y serología, por lo que no los consideramos eficaces para la caracterización de cepas del parásito.

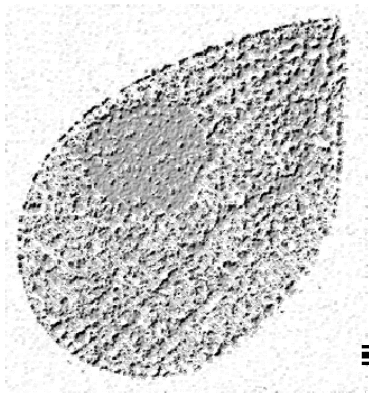
Como ya se mencionó anteriormente en la bibliografía, existe una gran controversia sobre la utilidad de los marcadores genéticos que se utilizan habitualmente en la caracterización de especies o cepas de ciliados. Los resultados de nuestros análisis genéticos muestran agrupamientos diferentes según el marcador genético utilizado. Si se utiliza el gen del ARNr 18S, los aislados se agrupan en dos grupos: uno con los aislados B1, C1 y P1, y otro con los aislados I1, D2, D3 y S1. Cuando se usa el gen de la Cox1, obtenemos 6 grupos, resultando agrupados los aislados I1 y D3, mientras que los otros se incluyen en grupos individuales, con el aislado P1 alejado de todos los demás. El análisis del gen de la β -tubulina indica que los aislados C1 y D2 pertenecen a un mismo grupo, así como los aislados B1 y S1, y ambos son diferentes al aislado I1; los aislados P1, y D3 son diferentes a los otros cinco y entre sí.

Sin embargo, los resultados de protección que hemos obtenido no coinciden totalmente con los grupos que resultan del análisis genético de estos tres genes. Entre los aislados D2 y D3 casi no existe protección cruzada, y sin embargo el análisis del ARNr 18S los agrupa en un mismo clúster, algo que no ocurre cuando se utilizan los otros dos genes. El análisis serológico indica también que los aislados P1 y S1 se encontrarían en el mismo grupo de protección que los aislados I1 y D3, lo que contrasta con los resultados de los análisis genéticos de estos tres genes. Por otro lado, el análisis de ambos genes de la β -tubulina y la Cox1 agrupa a los aislados C1 y D2 en un mismo cluster, lo que coincide con los datos serológicos y de protección, y el gen de la Cox1 agrupa además a los aislados I1 y D3, dato que también coincide. Pero el gen de la β -tubulina también agrupa a los aislados B1 y S1 en un mismo cluster, y

según los datos de los análisis serológicos es muy posible que no presenten protección cruzada entre ellos. Si bien parece apreciarse una cierta relación entre los serotipos y los genotipos obtenidos, sería necesario, para llegar a una conclusión definitiva sobre la utilidad de los análisis genéticos, repetir los ensayos utilizando fragmentos más grandes de estos tres genes o probar otros marcadores genéticos.

En varios trabajos se menciona que el análisis del ARNr es eficaz a nivel de especie, pero presenta fallos al utilizarlo por debajo de este nivel, mientras que los análisis de la β -tubulina y la Cox1 resultan válidos a un nivel filogenético más fino. La bibliografía también menciona una alta variación intraespecífica entre diferentes aislados de ciliados, e incluso entre clones, a todos los niveles y la dificultad para relacionar entre sí los niveles de variación obtenidos mediante diferentes tipos de ensayos.

Con los resultados obtenidos a partir del material del que disponemos, podemos concluir que estos siete aislados se agrupan en dos serotipos de protección: uno que incluye a los aislados B1, C1 y D2, y otro que incluye a los aislados I1, D3, P1 y S1. Sin embargo, sería necesario un estudio a mayor escala geográfica, con un mayor número de aislados, para comprobar si esto es realmente cierto.

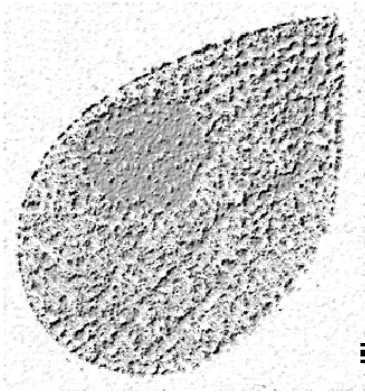


CONCLUSIONES

1. Los análisis morfométricos realizados en siete aislados de *Philasterides dicentrarchi* obtenidos de piscifactorías de España y Portugal indican una variabilidad morfológica entre ellos, que se localiza fundamentalmente en el ancho de la policinétida 3, la longitud de la membrana paraoral 2, la longitud del campo bucal, el ancho corporal, el ratio longitud/ancho, la longitud corporal, el ancho de la policinétida 1 y la distancia entre las policinétidas 2 y 3.
2. Los aislados de *P. dicentrarchi* muestran también claras diferencias en las tasas de crecimiento y conjugación y en la susceptibilidad al peróxido de hidrógeno. Sin embargo, los ciliados presentan una susceptibilidad similar al formol y al resveratrol.
3. Los aislados muestran una variación genética intraespecífica en las secuencias de los genes ARNr 18S, Cox1 y β -tubulina. El análisis del gen ARNr permite agruparlos en dos genotipos mientras que el análisis de los otros dos genes genera un agrupamiento en 6 y 5 genotipos, respectivamente.
4. Los ensayos serológicos y de protección permitieron el agrupamiento de los siete aislados en dos grandes grupos, entre los que la protección cruzada inducida es nula o muy baja. A su vez, dentro de cada grupo, los aislados presentan diferencias antigénicas entre sí e inducen protección cruzada parcial, que puede ser más o menos relevante dependiendo de la pareja utilizada en la vacunación/reto.
5. Los estudios morfológicos y ecofisiológicos no parecen ser de utilidad para la identificación de cepas en este ciliado, aunque sí son necesarios para la identificación de la especie o el establecimiento de programas de control de la escuticociliatosis. Los análisis genéticos y serológicos permiten una discriminación entre cepas más fiable. Para los primeros, el

gen de la β -tubulina ofrece unos resultados aceptables. Para los segundos, es necesario utilizar antisueros de ratón, con mayor poder discriminante que los de rodaballo, y seleccionar la cepa adecuada para generar el antisuero utilizado en el inmunoblot.

6. En una misma piscifactoría pueden coexistir varias cepas de *P. dicentrarchi* y participar simultáneamente en un mismo brote de escuticocilatosis. Por este motivo, a la hora de diseñar una vacuna para una piscifactoría particular es necesario determinar previamente los serotipos/genotipos que están causando las infecciones, y averiguar si inducen protección cruzada.



Anexo 1

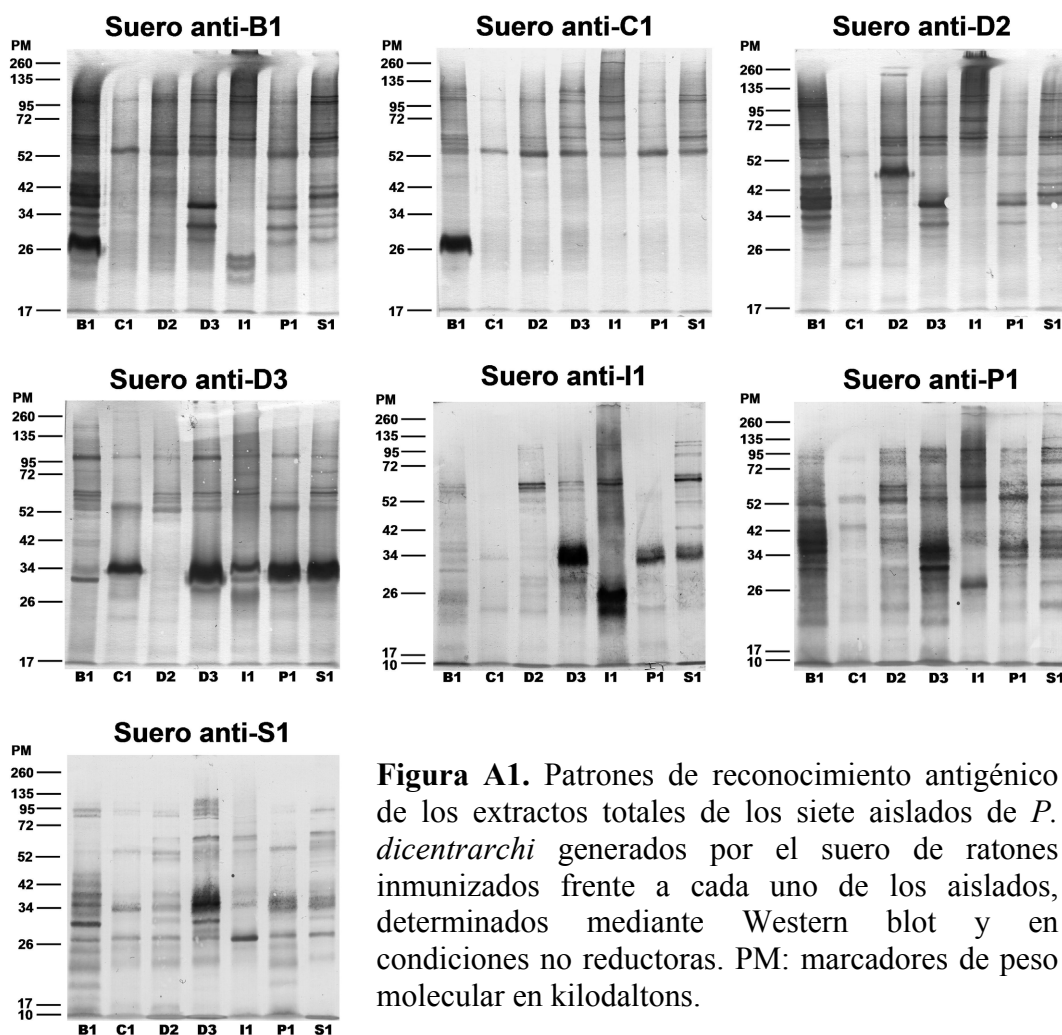


Figura A1. Patrones de reconocimiento antigénico de los extractos totales de los siete aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente a cada uno de los aislados, determinados mediante Western blot y en condiciones no reductoras. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

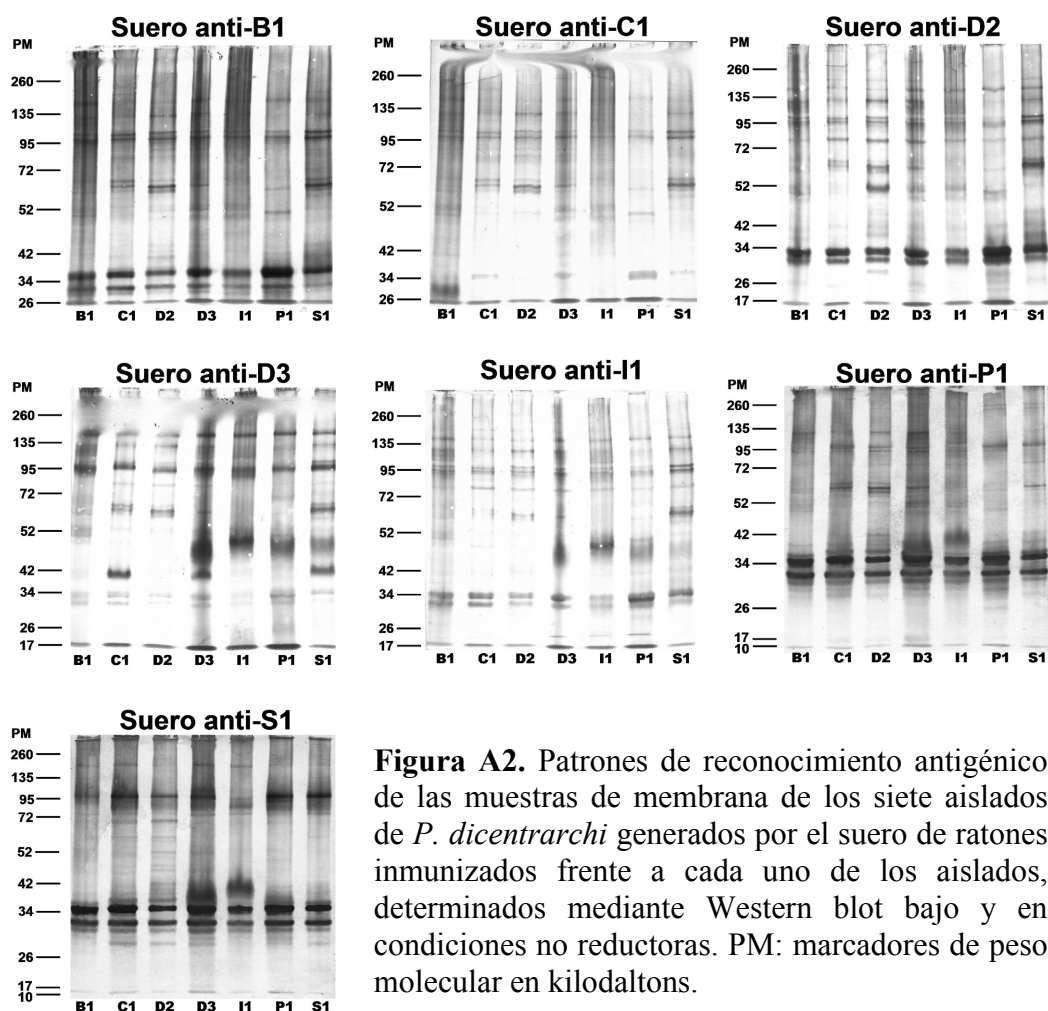


Figura A2. Patrones de reconocimiento antigénico de las muestras de membrana de los siete aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente a cada uno de los aislados, determinados mediante Western blot bajo y en condiciones no reductoras. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

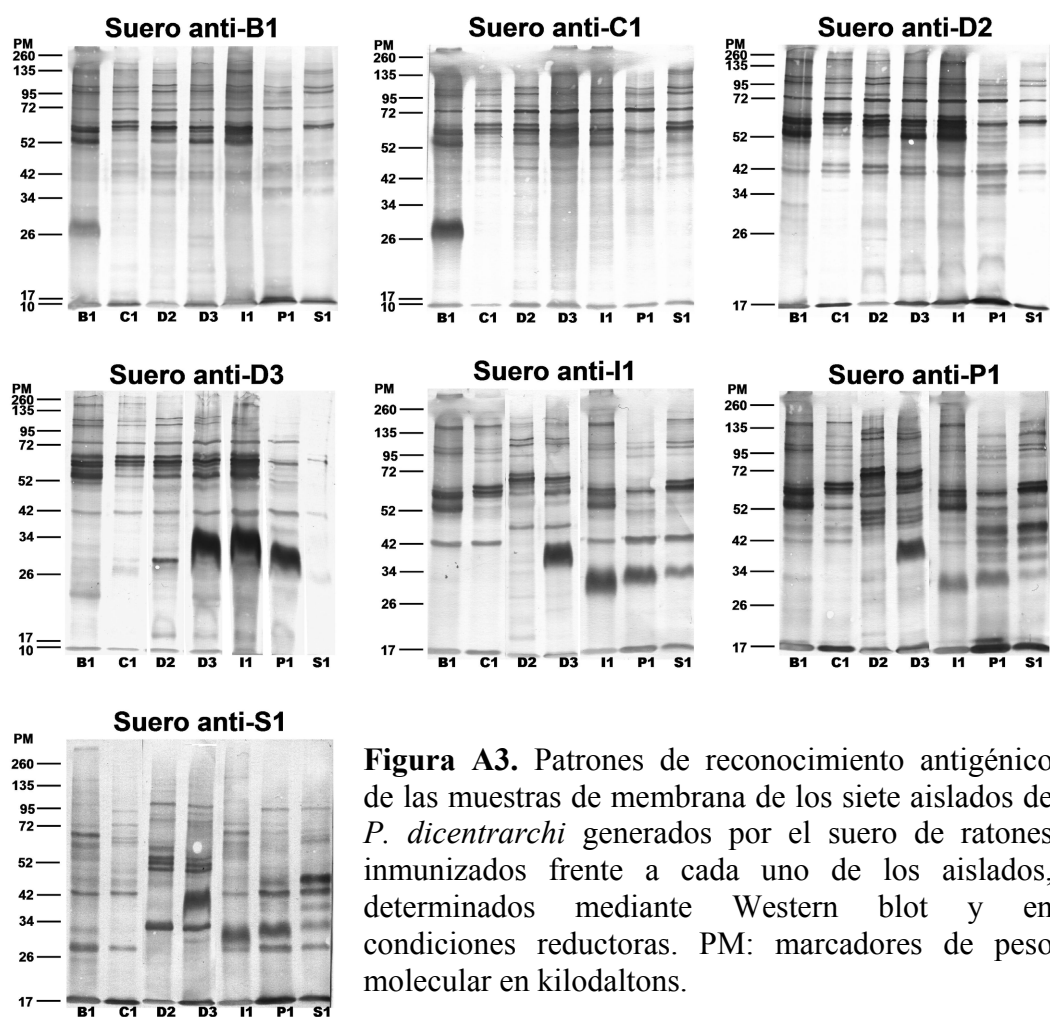


Figura A3. Patrones de reconocimiento antigénico de las muestras de membrana de los siete aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente a cada uno de los aislados, determinados mediante Western blot y en condiciones reductoras. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

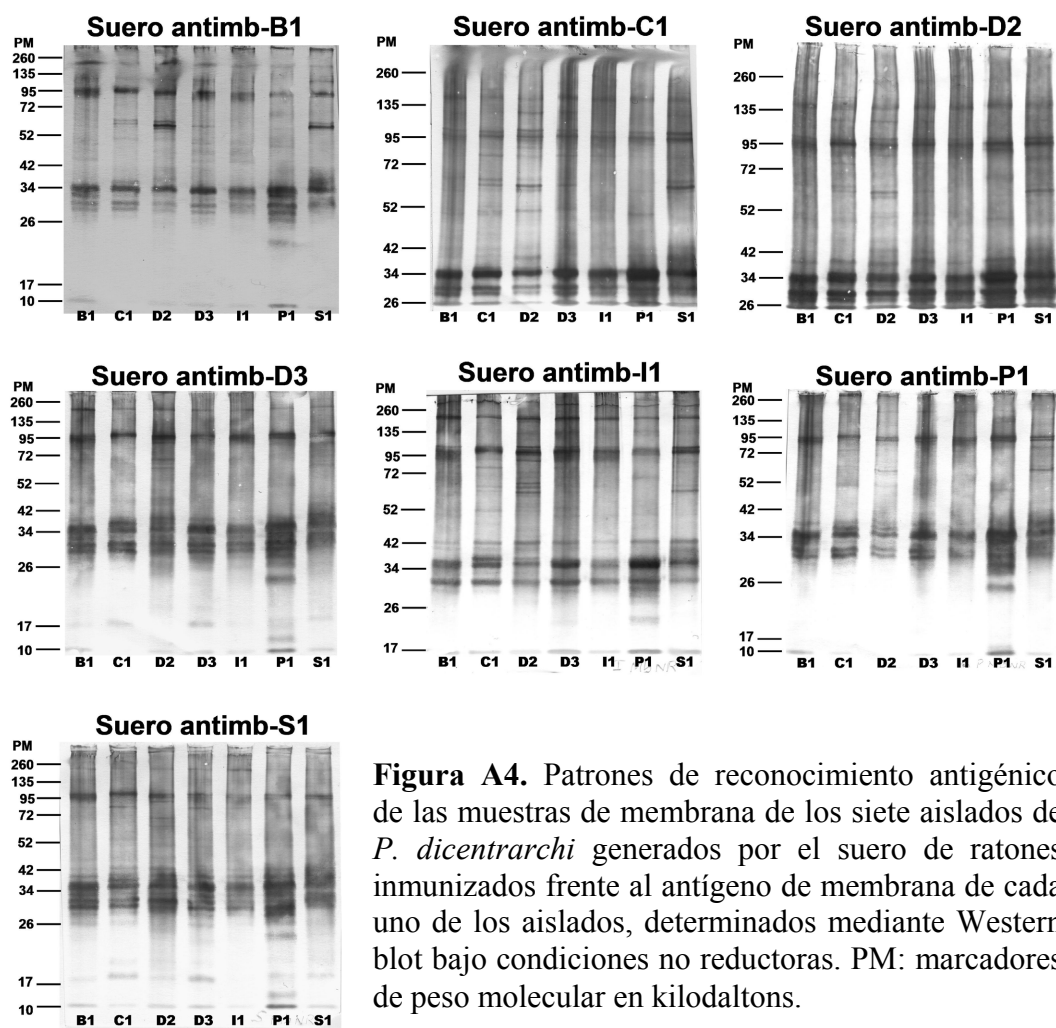


Figura A4. Patrones de reconocimiento antigénico de las muestras de membrana de los siete aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente al antígeno de membrana de cada uno de los aislados, determinados mediante Western blot bajo condiciones no reductoras. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

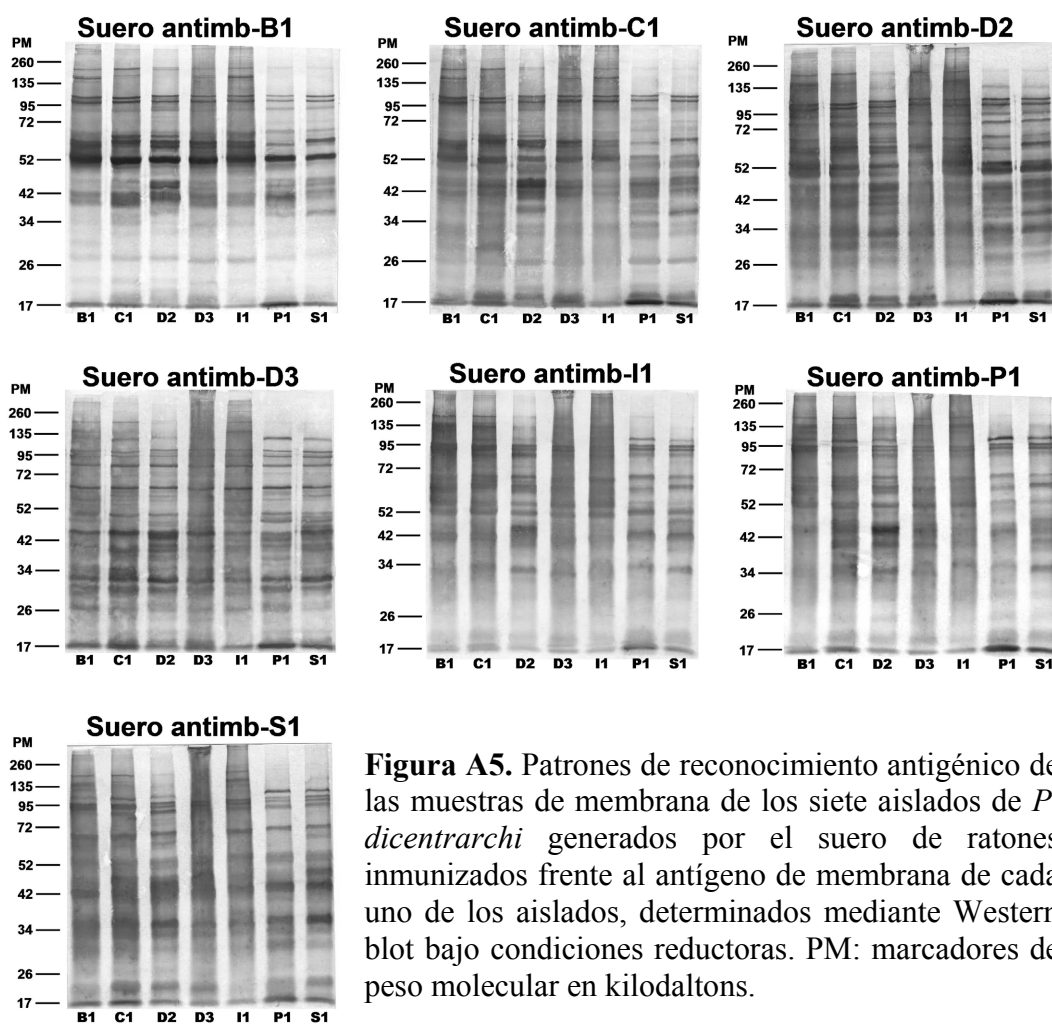


Figura A5. Patrones de reconocimiento antigénico de las muestras de membrana de los siete aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de ratones inmunizados frente al antígeno de membrana de cada uno de los aislados, determinados mediante Western blot bajo condiciones reductoras. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.

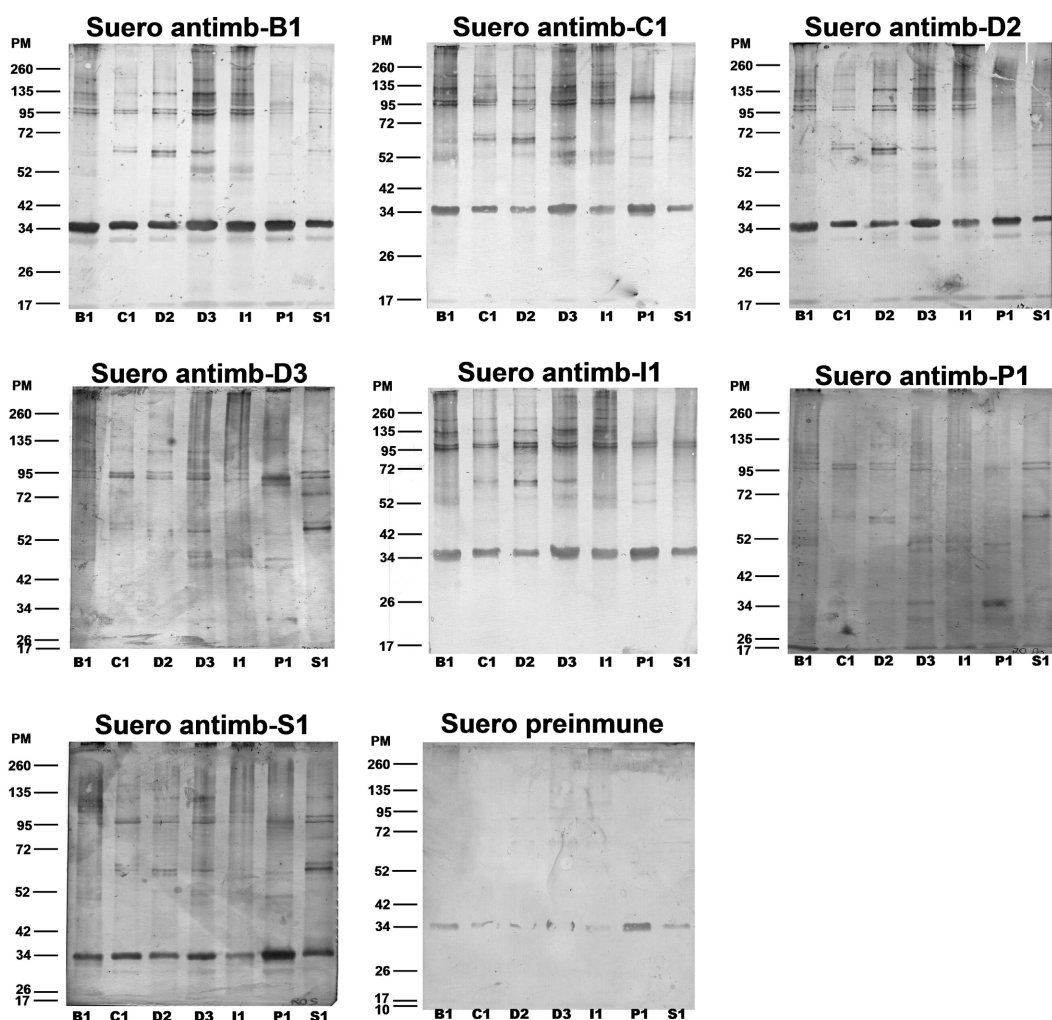
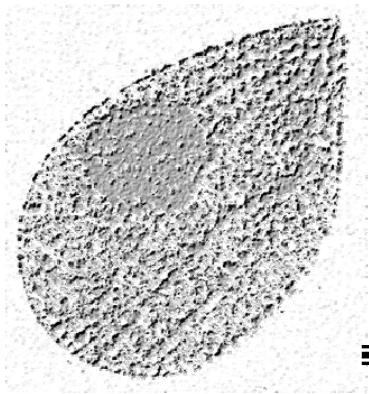


Figura A6. Patrones de reconocimiento antigénico de las muestras de membrana de los siete aislados de *P. dicentrarchi* generados por el suero de rodaballos inmunizados frente al antígeno de membrana de cada uno de los aislados y por el suero preimmune de rodaballo, determinados mediante Western blot bajo condiciones no reductoras. PM: marcadores de peso molecular en kilodaltons.



BIBLIOGRAFÍA

- Adl S.M., Leander B.S., Simpson A.G.B., Archibald J.M., Anderson O.R., Bass D., Bowser S.S., Brugerolle G., Farmer M.A., Karpov S., Kolisko M., Lane C.E., Lodge D.J., Mann D.G., Meisterfeld R., Mendoza L., Moestrup Ø., Mozley-Standridge S.E., Smirnov A.V., Spiegel, F. (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology*, **56** (4): 684-689.
- Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **52**: 399-451.
- Adoutte A., Fleury A. (1996). Cytoskeleton of ciliates. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann y P. Bradbury), pp. 41-49. Stuttgart, Fischer Verlag.
- Agatha S. (2004a). Evolution of ciliary patterns in the Oligotrichida (Ciliophora, Spirotricha) and its taxonomic implications. *Zoology*, **107**: 153-168.
- Agatha S. (2004b). New observations on the tontoniid ciliate *Spirotontonia grandis* (Suzuki and Han, 2000) Agatha 2004 (Ciliophora, Oligotrichia, Tontoniidae); comparison with the similar *Laboea strobila*. *European Journal of Protistology*, **40**: 295-301.
- Agatha S., Riedel-Lorjé J.C. (2006). Redescription of *Tintinnopsis cylindrica* Daday, 1887 (Ciliophora: Spirotricha) and unification of tintinnid terminology. *Acta Protozoologica*, **45** (2): 137-151.
- Aguilar A. (2006). Estudio de la parasitofauna de *Anguilla anguilla* (L., 1758) en los ríos Ulla y Tea (Galicia, N.O. de España). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España), 247 pp.
- Aguilar A., Álvarez M.F., Leiro J.M., Sanmartín M.L. (2005). Parasite populations of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in the rivers Ulla and Tea (Galicia, northwest Spain). *Aquaculture*, **249**: 85-94.
- Allen R.D., Schroeder C.C., Fok A.K. (1992). Endosomal system of *Paramecium*: coated pits to early endosomes. *Journal of Cell Science*, **101**: 449-461.
- Álvarez-Pellitero P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **126**: 171-198.

- Álvarez-Pellitero P., Palenzuela O., Padrós F., Sitjà-Bobadilla A., Ríaza A., Silva A., Arán J. (2004b). Histophagous scuticociliatids (Ciliophora) parasiting turbot *Scophthalmus maximus*:: morphology, *in vitro* culture and virulence. *Folia Parasitologica*, **51**: 177-187.
- Álvarez-Pellitero P., Palenzuela O., Sitjà-Bobadilla A. (2008). Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitology International*, **57**: 110-20.
- Álvarez-Pellitero P., Quiroga M.I., Sitjà-Bobadilla A., Redondo M.J., Palenzuela O., Padrós F., Vázquez S., Nieto J.M. (2004a). *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**(1-2): 133-145.
- Ammermann D., Schlegel M., Helmer K-H. (1989). North American and Eurasian strains of *Stylonichia lemnae* (Ciliophora, Hypotrichida) have a high genetic identity, but differ in the nuclear apparatus and in their mating behaviour. *European Journal of Protistology*, **25**: 67-74.
- Ammermann D. (2008). Cell size and dorsal cilia: are they useful features for the identification of *Stylonichia mytilus* (Ciliophora, Spirotrichea) and its subpopulations?. *European Journal of Protistology*, **44**(4): 263-268.
- Anderson D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish. Applications to aquaculture. *Annu Rev Fish Dis*, **2**: 281-307.
- Angulo L., Lopez J.E., Vicente J.A., Saborido A.M. (1994) Hemorrhagic areas in the mouth of farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **17**: 163-169.
- Antony C., Capdeville Y. (1989). Uneven distribution of surface antigens during antigenic variation in *Paramecium primaurelia*. *Journal of Cell Science*, **92**: 205-215.
- Aoki T. (1992). Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. En *Diseases in Asian Aquaculture* (Eds. I.M. Shariff, R.P. Subasinghe, J.R. Arthur), pp. 519-529. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Filipinas.
- APROMAR (2010). La acuicultura marina de peces en España. Asociación Empresarial de Productores de cultivos Marinos.
- Aufderheide K.J., Rotolo T.C., Grimes G.W. (1999). Analyses of inverted ciliary rows in *Paramecium*. Combined light and electron microscopic observations. *European Journal of Protistology*, **35**(1): 81-91.

- Augustin H., Foissner W., Adam H. (1984). An improved pyridinated silver carbonate method which need few specimens and yields permanent slides of impregnation ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Mikroskopie*, **41**: 134-137.
- Avendaño-Herrera R., Magariños B., Irgang R., Toranzo A.E. (2006). Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, **257**: 104-110.
- Azad I.S., Al-Marzouk A., James C.M., Almatar S., Al-Gharabally H. (2007). Scuticociliatosis-associated mortalities and histopathology of natural infection in cultured silver pomfret (*Pampus argenteus* Euphrasen) in Kuwait. *Aquaculture*, **262**: 202-210.
- Banchetti R., Erra F. (2003). The locomotion of living organisms. Some hints for an evolutionistic reconsideration of biology's "Foregone" topics. *Rivista di Biologia-Biology Forum*, **96**(3): 441-455.
- Baroin A., Perasso R., Qu L.H., Brugerolle G., Bachellerie J.P., Adoutte A. (1988). Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. *Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America*, **85**: 3474-3478.
- Barth D., Krenek S., Fokin S., Berendonk T.U. (2006). Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**: 20-25.
- Barth D., Tischer K., Berger H., Schlegel M., Berendonk T.U. (2008). High mitochondrial haplotype diversity of *Coleps* sp. (Ciliophora: Prostomatida). *Environmental Microbiology*, **10**: 626-634.
- Beale G.H., Mott M.R. (1962). Further studies on the antigens of *Paramecium aurelia* with the aid of fluorescent antibodies. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **28**: 617-623.
- Beers, C.D. (1933). Diet in relation to depression and recovery in the ciliate *Didinium nasutum*. *Archiv für Protistenkunde*, **79**: 101-118.
- Belbahri L., McLeod A., Paul B., Calmin G., Moralejo E., Spies C.F., Botha W.J., Clemente A., Descals E., Sánchez-Hernández E., Lefort F. (2008). Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (Pythiaceae). *FEMS Microbiology Letters*, **284**: 17-27.
- Bernhard D., Schlegel M. (1998). Evolution of histone H4 ana H3 genes in different ciliate lineages. *Journal of Molecular Evolution*, **46**: 344-354.

- Boenigk J., Jost S., Stoeck T., Garstecki T. (2007). Differential thermal adaptation of clonal strains of a protist morphospecies originating from different climatic zones. *Environmental Microbiology*, **9**: 593-602.
- Boenigk J., Pfandl K., Stadler P., Chatzinotas A. (2005). High diversity of the “*Spumella*-like” flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environmental Microbiology*, **7**: 685-697.
- Bordier, C. (1981). Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. *Journal of Biochemistry*, **256**(4): 1604-1607.
- Boshra H., Li J., Sunyer J.O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**: 239-262.
- Boyd C.E. (1990). *Water Quality in Ponds for Aquaculture*. Auburn University, Alabama, AL, USA.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein by binding. *Analytical Biochemistry*, **72**(1-2): 248-254.
- Brown, J.A.G., Jones A., Matty A.J. (1984). Oxygen metabolism of farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). 1. The influence of fish size and water temperature on metabolic rate. *Aquaculture*, **36**: 273-281.
- Bruschi F. (1999). How can *Trichinella* escape the host immune response. *Helminthologia*, **36**: 179-84.
- Buchmann K., Jensen P.B., Kruse K.D. (2003). Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *in vitro* experiments. *North American Journal of Aquaculture*, **65**(1): 21-24.
- Buchmann K., Lindenstrøm T. (2002). Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology*, **32**: 309-319.
- Buchmann K., Lindenstrøm T., Bresciani J. (2001). Defence mechanisms against parasites in fish and the prospect for vaccines. *Acta Parasitologica*, **46**: 71-81.
- Buchmann, K., Kristensson, R.T. (2003). Efficacy of sodium percarbonate and formaldehyde bath treatments against *Gyrodactylus derjavini* infestations of rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, **65**(1): 25-27.
- Budin K., Philippe H. (1998). New insights into the phylogeny of eukaryotes based on ciliate Hsp70 sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **15**: 943-956.

- Budiño B., Lamas J., Pata M.P., Arranz J.A., Sanmartín M.L., Leiro J. (2011). Intraspecific variability in several isolates of *Philasterides dicentrarchi* (syn. *Miamiensis avidus*), a scuticociliate parasite of farmed turbot. *Veterinary Parasitology*, **175**: 260-272.
- Caetano-Anollés G. (2002). Tracing the evolution of RNA structure in ribosomes. *Nucleic Acids Res.*, **30**: 2575-2587.
- Cameron S.L., O'Donoghue P.J. (2002). The ultrastructure of *Amylovorax dehorityi* comb. nov. and erection of the Amylovoracidae fam. nov. (Ciliophora: Trichostomatia). *European Journal of Protistology*, **38**(1): 29-44.
- Castro N., Toranzo A.E., Barja J.L., Núñez S., Magariños, B. (2006). Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot. *Journal of Fish Diseases*, **29**: 541-547.
- Castro R., Couso N., Obach A., Lamas J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, **9**: 529-541.
- Castro R., Paramá A., Barja J.L., Leiro J., Sanmartín M.L., Lamas J. (2007). Culture of the histophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatia) in fish tissues. *Journal of Fish Diseases*, **30**(4): 239-242.
- Cawthorn R.J. (1997). Overview of 'bumper car' disease -Impact on the North American lobster fishery. *International Journal for Parasitology*, **27**(2): 167-172.
- Cawthorn R.J., Lynn D.H., Despres B., MacMillan R., Maloney R., Loughlin M., Bayer, R. (1996). Description of *Anophryoides haemophila* n. sp. (Scuticociliatida: Orchitophryidae), a pathogen of American lobsters *Homarus americanus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **24**(2): 143-148.
- Chan M.M. (2002). Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology*, **63**: 99-104.
- Chantangsi C., Lynn D.H. (2008). Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome c oxidase subunit 1 and the small subunit ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**: 979-987.
- Chantangsi C., Lynn D.H., Brandl M.T., Cole J.C., Hetrick N., Ikonomi P. (2007). Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus *Tetrahymena*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**: 2412-2425.
- Chapman G.B., Kern R.C. (1983). Ultrastructural aspects of the somatic cortex and contractile vacuole of the ciliate, *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. *Journal of Protozoology*, **30**: 481-490.

- Chatterjee A., Bagchi D., Yasmin T., Stohs S.J. (2005). Antimicrobial effects of antioxidants with and without clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **270**: 125-130.
- Chatton E., Lwoff A. (1930). Imprégnation par diffusion argentique de l'infusiliature des ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans dessiccation. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, **104**: 834-836.
- Chen Z., Song W., Warren A. (2000). Studies on six *Euplotes* spp. (Ciliophora: Hypotrichida) using RAPD fingerprinting, including a comparison with morphometric analyses. *Acta Protozoologica*, **39**: 209-216.
- Cheung, P.J., Nigrelli, R.F., Ruggieri, G.D. (1980). Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliata: Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. *Journal of Fish Diseases*, **3**: 295-303.
- Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M. (2007). Review on the immunology of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **117**: 1-16.
- Chung B.S., Pars Y.K., Huh S., Yu J.R., Kim J., Shi X., Cho S.R., Lee S.H., Hong S.T. (2000). Genetic heterogeneity of *Pneumocystis carinii* from rats of several regions and strains. *Korean Journal of Parasitology*, **38**: 151-158.
- Clarholm M. (2005). Soil Protozoa: An Under Researched Microbiana Group Gaining Momentum. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**: 811-837.
- Clayton G.M., Price D.J. (1992). Interspecific and intraspecific variation in resistance to ichthyophthiriasis among poeciliid and goodeid fishes. *Journal of Fish Biology*, **40**: 445-453.
- Cohan F.M. (2002).. What are bacterial species?. *Annual Review of Microbiology*, **56**: 457-487.
- Cohan F.M. (2006). Toward a conceptual and operation union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*, **361**: 1985-1996.
- Coleman A.W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, **19**: 370-375.
- Coleman A.W. (2005). *Paramecium aurelia* revisited. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **52**: 68-77.
- Corliss J.O. (1974). Remarks on the composition of the large ciliate class Kinetofragminophora de Puytorac *et al.*, 1974, and recognition of several new taxa

- therein, with emphasis on the primitive order Protociliatida n. ord. *Journal of Protozoology*, **21**: 207-220.
- Corliss J.O. (1956). On the evolution and systematic of ciliate protozoa. *Systematic Zoology*, **5**: 121-140.
- Corliss J.O. (1964). The value of stomatogenesis in studies of ciliate phylogeny and systematics. *Journal of Protozoology*, **11**: 4.
- Corliss J.O. (1979). *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature*, 2nd edition. Pergammon Press, Oxford.
- Corliss J.O. (1994). An interim Utilitarian (user-friendly) Hierarchical Classification and Characterization of the Protists. *Acta Protozoologica*, **33**: 1-51.
- Craig A., Scherf A. (2003). *Antigenic variation*. Academic Press Elsevier, Oxford.
- Crossa J., Franco J. (2004). Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica*, **137**:19-37.
- Cruz E.R., Pitogo C.L. (1989). Tolerance level and histopathological response of milkfish (*Chanos chanos*) fingerlings to formalin. *Aquaculture*, **78**: 135-145.
- Cruz L.P., Gaitan A.L., Gongora C.E. (2006). Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **71**: 918-926.
- Curds C.R. (1985). The species problem in ciliates – a taxonomist's view. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali, Memorie Serie B*, **92**: 29-41.
- Curds C.R., Cockburn A. (1971). Continuous monoxenic culture of *Tetrahymena piriformis*. *Journal of General Microbiology*, **66**: 95-108.
- Curry A., Butler R.D. (1982). Asexual reproduction in the suctorian *Discophrya collini*. *Protoplasma*, **111**: 195-205.
- Dalmo R.A., Bogwald J. (2008). β -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & Shellfish Immunology*, **25**: 384-396.
- Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, **25**(10): 472-479.
- Dempster A., Rubin D. (1983). Incomplete data in sample surveys. En *Sample Surveys Vol. II: Theory and Annotated Bibliography* (Eds. W.G. Madow, I. Olkin, D. Rubin), pp.3-10. Academic Press, New York.

- Denkers E.Y., Butcher B.A. (2005). Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends in Parasitology*, **21**: 35-41.
- Densmore C.L., Ottinger C.A., Blazer V.S., Iwanowicz L.R. (2004). Immunomodulation and disease resistance in postyearling rainbow trout infected with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *Journal of Aquatic Animal Health*, **16**: 73-82.
- Devesa S. (1996). Patología del rodaballo *Scophthalmus maximus* L. cultivado en Galicia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España), 215 pp.
- Díaz S., Martín-González A., Rico D., Gutiérrez J.C. (2003). Morphogenesis of the division and encystment process of the ciliated protozoan *Colpoda minima*. *Journal of Natural History*, **37**(20): 2395-2412.
- Dickerson H.W. (2006). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). En: *Fish Diseases and Disorders* Vol. 1, 2nd edition (Ed. P.T.K. Woo), pp. 116-153. Oxfordshire, United Kingdom.
- Dickerson H.W., Clark T.G., Leff A.A. (1993). Serotypic variation among isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* based on immobilization. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**: 816-820.
- Diggles B.K., Lester R.J. (1996). Variation in the development of two isolates of *Cryptocaryon irritans*. *Journal of Parasitology*, **82**: 384-388.
- Dini F., Nyberg D. (1999). Growth rates of marine ciliates on diverse organisms reveal ecological specializations within morphospecies. *Microbial Ecology*, **37**: 13-22.
- Docherty J.J., Sweet T.J., Bailey E., Faith S.A., Booth T. (2006). Resveratrol inhibition of varicella-zostervirus replication in vitro. *Antiviral Research*, **72**: 171-177.
- Doerder F.P. (1981). Differential expression of immobilization antigen genes in *Tetrahymena thermophila* 2. Reciprocal and nonreciprocal transfer of i-antigen during conjugation and expression of i-antigen genes during macronuclear development. *Cell Differentiation*, **10**: 299-307.
- Doerder F.P., Arslanyolu M., Saad Y., Kaczmarek M., Mendoza M., Mita B. (1996). Ecological genetics of *Tetrahymena thermophila*: mating types, i-antigens, multiple alleles and epistasis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **43**: 95-100.
- dos Santos N.M.S., do Vale A., Sousa M.J., Silva M.T. (2002). Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **52**: 87-91.
- Dragesco A., Dragesco J., Coste F., Gasc C., Romestand B., Raymond J., Bouix G. (1995). *Philasterides dicentrarchi*, n. sp. (Ciliophora, Scuticociliatida), a histophagous

- opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. *European Journal of Protistology*, **31**: 327-340.
- Dyková I., Figueras A. (1994). Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histophagous ciliate. *Diseases of Aquatic Organisms*, **18**: 5-9.
- Dyková I., Figueras A., Novoa B., Fernández J.C. (1998). *Paramoeba* sp., an agent of amoebic gill disease of turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **33**: 137-141.
- Edwards J.A., Beck M., Riegger C., Bausch J. (2011). Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida®. *Ann N Y Acad Sci*, **1215**: 131-137.
- Elde N.C., Morgan G., Winey M., Sperling L., Turkewitz A.P. (2005). Elucidation of clathrin-mediated endocytosis in *Tetrahymena* reveals an evolutionarily convergent recruitment of dynamin. *PLoS Genetics*, **1**(5): 514-526.
- Else K.J. (2005). Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system?. *Parasite Immunology*, **27**: 407-415.
- Estévez J., Leiro J., Santamarina M.T., Domínguez J., Ubeira F.M. (1994). Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **41**: 353-366.
- Estévez J., Leiro J., Santamarina M.T., Ubeira F.M. (1995). A sandwich immunoassay to quantify low levels of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **45**(1-2): 165-174.
- Excoffier L., Laval G., Balding D. (2003). Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptative window approach. *Human Genomics*, **1**: 7-19.
- Excoffier L., Slatkin M. (1995). Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 921-927.
- FAO (2002). Antibiotics residue in aquaculture products. The state of world fisheries and aquaculture, pp. 74-82. Roma, Italia.
- FAO (2007). The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA) 2006. FAO fisheries and Aquaculture Department, Roma, Italia.
- Fast N.M., Xue L., Bingham S., Keeling P.J. (2002). Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **49**: 30-37.
- Fauré-Fremiet E. (1945). Symétrie et polarité chez les ciliés bi- ou multicomposites. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, **79**: 106-150.

- Fauré-Fremiet E. (1948). Doublets homopolaires et régulation morphogénétique chez le cilié *Leucophrys patula*. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, **37**: 183-203.
- Fauré-Fremiet J. (1950). Morphologie comparée et systématique des ciliés. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, **75**: 109-122.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: and approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.
- Fenchel T. (1993). There are more small than large species?. *Oikos*, **68**: 375-378.
- Fenchel T., Finlay B.J. (1983). Respiratory rates in heterotrophic, free-living protozoa. *Microbial Ecology*, **9**: 99-122.
- Fernández-Galiano D. (1994). The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa from sewage (and other) waters. *Water Research*, **28**: 495-496.
- Fernández-Pato C., Martínez-Tapia I., Chereguini O., Sola E., (1990). Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L) from 1 to 3000 g in the North of Spain. *ICES C.M.1990/F:29*.
- Fiala I., Dyková I. (2003). Molecular characterization of *Neoparamoeba* strains isolated from gills of *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **55**(1): 11-6.
- Figueras A., Novoa B., Santarem M., Martínez E., Álvarez J.M., Toranzo A.E., Dyková I. (1992). *Tetramicra brevifilum*, a potential threat to farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **14**: 127-135.
- Finlay B., Corliss J., Esteban G., Frenchet T. (1996). Biodiversity at the microbiana level: the number of free-living ciliates in the biosphere. *Quarterly Review of Biology*, **71**: 221-237.
- Finlay B.J. (1997). The global diversity of protozoa and other small species. *Australian biologist*, **10**: 131-151.
- Finlay B.J. (2004). Protist taxonomy: an ecological perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*, **359**: 599-610.
- Finlay B.J., Esteban G.F., Brown S. (2006). Multiple cosmopolitan ectotypes within a microbial eukaryote morphospecies. *Protist*, **157**: 377-390.
- Finney D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd Edition. Cambridge University Press, London.
- Fleckerton R.P. (2002). Chaotic mating systems. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 493-495.

- Fletcher T.C., White A., Baldo B.A. (1980). Isolation of a phosphorylcholine-containing component from the turbot tapeworm, *Bothriocephalus scorpii* (Muller), and its reaction with C reactive protein. *Parasite Immunology*, **2**: 237-48.
- Fleury A., Delgado P., Iftode F., Adoutte A. (1992). Molecular phylogeny of ciliates: what does it tell us about the evolution of the cytoskeleton and of developmental strategies? *Developmental Genetics*, **13**: 247-254.
- Foissner W. (1991). Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *European Journal of Protistology*, **27**: 313-330.
- Foissner W. (1996). Ontogenesis in ciliated protozoa, with emphasis in stomatogenesis. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann y P. Bradbury), pp. 95-178. Stuttgart:, Fischer, Verlag.
- Foissner W., Müller H., Agatha S. (2007). A comparative fine structural and phylogenetic analysis of resting cysts in oligotrich and hypotrich Spirotrichea (Ciliophora). *European Journal of Protistology*, **43**: 295-314.
- Foissner W., Müller H., Weisse T. (2005). The unusual, lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): light and scanning electron microscopy, cytochemistry. *Acta Protozoologica*, **44**: 201-215.
- Foissner W., Stoeck T., Schmidt H., Berger H. (2001). Biogeographical differences in a common soil ciliate, *Gonostomum affine* (Stein), as revealed by morphological and RAPD-fingerprint analysis. *Acta Protozoologica*, **40**: 83-97.
- Fokin S.I., Przyboś E., Chivilev M. (2001). Nuclear reorganization variety in *Paramecium* (Ciliophora : Peniculida) and its possible evolution. *Acta Protozoologica*, **40**: 249-261.
- Fouz B., Larsen J.L., Nielsen B., Barja J.L. Toranzo A.E. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, **12**: 155-166.
- Frankel J. (2008). What do genic mutations tell us about the structural patterning of a complex single-celled organism?. *Eukaryotic Cell*, **7**(10): 1617-1639.
- Frankel J., Jenkins L.M., Bakowska J. (1984). Selective mirror-image reversal of ciliary patterns in *Tetrahymena thermophila* homozygous for a *janus* mutation. *Roux's Archives of Developmental Biology*, **194**: 107-120.
- Frankel J., Nelson E.M. (1986). How the mirror-image pattern specified by a *janus* mutation of *Tetrahymena* comes to expression. *Developmental Genetics*, **6**: 213-238.

- Fyda J., Kennaway G., Adamus K., Warren A. (2006). Ultrastructural events in the predator-induced defence response of *Colpidium kleini* (Ciliophora: Hymenostomatia). *Acta Protozoologica*, **45**: 461-464.
- Ganguly S., Paul I., Mukhopadhyay S.K. (2010). Application and Effectiveness of Immunostimulants, Probiotics, and Prebiotics in Aquaculture: A Review. *Israeli Journal of Aquaculture-BAMIDGEH*, **62**: 130-138.
- Gao F., Fan X., Yi Z., Strüder-Kypke M., Song W. (2010). Phylogenetic consideration of two scuticociliate genera, *Philasterides* and *Boveria* (Protozoa, Ciliophora) based on 18S rRNA gene sequences. *Parasitology International*, **59**(4): 549-55.
- Gätcher E., Weisse T. (2006). Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. I. Temperature response. *Aquatic Microbial Ecology*, **45**: 291-300.
- Gates M.A., Berger J. (1974). A biometric study of three strains of *Tetrahymena pyriformis* (Ciliata: Hymenostomatida). *Canadian Journal of Zoology*, **52**: 1167-1183.
- Gates M.A., Powelson E.E., Berger J. (1975). Syngenic ascertainment in *Paramecium aurelia*. *Systematic Zoology*, **23**: 482-489.
- Gelei J. von., Horváth, P. (1931). Eine nasse Silber-bzw. Goldmethode für die Herstellung der reizleitenden Elemente bei den Ciliaten. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*, **48**: 9-29.
- Gentekaki E., Lynn D.H. (2009). High genetic diversity but no population structure of the peritrichous ciliate *Carchesium polypinum* in the Grand River basin (North America) inferred from nuclear and mitochondrial markers. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(10): 3187-3195.
- Gillespie J.J., Yoder M.J., Wharton R.A. (2005). Predicted secondary structure for 28S and 18S rRNA from Ichneumonodea (Insecta: Hymenoptera: Aprocrita): impact in sequence alignment and phylogeny estimation. *Journal of Molecular Evolution*, **61**: 114-137.
- Gilron G.L., Lynn D.H. (1989). Estimates of in situ populations growth rates of four Tintinnine Ciliate species near Kingston Harbour, Jamaica. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **29**: 1-10.
- Gómez Saladín E., Small E.B. (1993a). Starvation induces tomitogenesis in *Miamiensis avidus* Strain Ma/2. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**(6): 727-730.
- Gómez Saladín E., Small E.B. (1993b). Prey-induced transformation of *Miamiensis avidus* Strain Ma/2 by a soluble factor. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**(5): 550-556.

- Gómez Saladín E., Small E.B. (1993c). Oral morphogenesis of the microstome to macrostome transformation in *Miamiensis avidus* Strain Ma/2. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**(3): 363-370.
- González S.F., Buchmann K., Nielsen M.E. (2007a). Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: inflammatory responses caused by the ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, **22**: 641-650.
- González S.F., Buchmann K., Nielsen M.E. (2007b). Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Developmental and Comparative Immunology*, **31**(6): 576-586.
- Greenwood S.J., Schlegel M., Sogin M.L., Lynn D.H. (1991a). Phylogenetic relationships of *Blepharisma americanum* and *Colpoda in ata* within the Phylum Ciliophora inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. *Journal of Protozoology*, **38**: 1-6.
- Greenwood S.J., Sogin M.L., Lynn D.H. (1991b). Phylogenetic relationships within the class Oligohymenophorea, phylum Ciliophora, inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Colpidium campylum*, *Glaucoma chattoni*, and *Opisthonecta henneguyi*. *Journal of Molecular Evolution*, **33**: 163-174.
- Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H., Lewontin R. (1999). The Molecular Basis of Mutation. En *Modern Genetic Analysis* (Eds. W.H. Freeman and Company). ISBN 0-7167-3597-0.
- Grim J.N. (2006). Food vacuole contents in the ciliate, *Balantidium jocularum* (Balantididae), a symbiont in the intestine of the surgeonfish, *Naso tonganus* (Acanthuridae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**(4): 269-274.
- Grolière C.A., Leglise M. (1977). *Paranophrys carcini* n. sp., cilié Philasterina récolté dans l'hémolymph du crabe *Cancer pagurus* Linné. *Protistologica*, **13**: 503-507.
- Grønlien H.K., Berg T., Løvlie A.M. (2002). In the polymorphic ciliate *Tetrahymena vorax*, the non-selective phagocytosis seen in microstomes changes to a highly selective process in macrostomes. *The Journal of Experimental Biology*, **205**: 2089-2097.
- Gruber A.R., Lorenz R., Bernhart S.H., Neuböck R., Hofacker I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, **36**(Web Server issue):W70-4.
- Gutiérrez J.C., Callejas S., Borniquel S., Benítez L., Martín-González A. (2001). Ciliate cryptobiosis: a microbial strategy against environmental starvation. *International Microbiology*, **4**: 151-157.

- Gutiérrez J.C., Díaz S., Ortega R., Martín-González A. (2003). Ciliate resting cyst walls: a comparative review. *Recent Research Developments in Microbiology*, **7**: 361- 379.
- Harikrishnan R., Jin C.N., Kim M.C., Kim J.S., Balasundaram C., Heo M.S. (2010). Effectiveness and immunomodulation of chemotherapeutants against scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* in olive flounder. *Experimental Parasitology*, **124**(3): 306-314.
- Harumoto T., Miyake A. (1993). Possible participation of surface antigens in the predator-prey interaction between *Didinium* and *Paramecium*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**: 27A (Abstract).
- Hastie T.J., Tibshirani R.J. (1990). Generalized additive models. Chapman and Hall, London.
- Heinecke R.D., Buchmann K. (2009). Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: Dose-response studies. *Aquaculture*, **288**: 32-35.
- Hirono M., Nakamura M., Tsunemoto M., Yasuda T., Ohba H., Numata O., Watanabe, Y. (1987). *Tetrahymena* actin: localization and possible biological roles of actin in *Tetrahymena* cells. *Journal of Biochemistry-Tokyo*, **102**: 537-545.
- Hofacker I.L. (2003). Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3429-3431.
- Hofacker I.L., Fekete M., Flamm C., Huynen M.A., Rauscher S., Stolorz P.E., Stadler P.F. (1998). Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes. *Nucleic Acids Research*, **26**: 3825-3836.
- Hofacker I.L., Fontana W., Stadler P.F., Bonhoeffer S., Tacker M., Schuster P. (1994). Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatshefte für Chemie*, **125**: 167-188.
- Hoffman D.C., Prescott D.M. (1997). Phylogenetic relationships among Hypotrichous ciliates determined with the macronuclear gene encoding the large, catalytic subunit of DNA polymerase. *Journal of Molecular Evolution*, **45**: 301-310.
- Holland M.C.H., Lambris J.D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, **12**: 399-420.
- Hosein R.E., Williams S.A., Haye K., Gavin R.H. (2003). Expression of GFP-actin leads to failure of nuclear elongation and cytokinesis in *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**(6): 403-408.

- Hu X.Z., Warren A., Song W.B. (2008). Stomatogenesis and morphological re-description of the marine ciliate, *Philasterides armatalis* (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **88**: 29-34.
- Hu X.Z., Warren A., Suzuki T. (2004). Morphology and morphogenesis of two marine ciliates, *Pseudokeronopsis pararubra* sp. n. and *Amphisiella annulata* from China and Japan (Protozoa: Ciliophora). *Acta Protozoologica*, **43**(4): 351-368.
- Iftode F., Fleury-Aubusson A. (2003). Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biology of the Cell*, **95**(1): 39-51.
- Iglesias R., Leiro J., Ubeira F.M., Santamarina M.T., Sanmartín M.L. (1993). Anisakis simplex: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunology*, **15**: 243-250.
- Iglesias R., Paramá A., Álvarez M.F., Leiro J., Aja C., Sanmartín M.L. (2003b). *In vitro* growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Veterinary Parasitology*, **111**: 19-30.
- Iglesias R., Paramá A., Álvarez M.F., Leiro J., Fernández J., Sanmartín M.L. (2001). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, **46**: 47-55.
- Iglesias R., Paramá A., Álvarez M.F., Leiro J., Sanmartín M.L. (2002). Antiprotozoals effective *in vitro* against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **49**: 191-197.
- Iglesias R., Paramá A., Álvarez M.F., Leiro J., Ubeira F.M. (2003a). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology*, **126**: 125-134.
- Imsland A.K., Folkvord A., Grung G.L., Stefansson S.O., Taranger G.L. (1997). Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). *Aquaculture Research*, **28**: 101-114.
- Intorre L., Meucci V., Di Bello D., Monni G., Soldani G., Pretti C. (2007). Tolerance of benzalkonium chloride, formalin, malachite green, and potassium permanganate in goldfish and zebrafish. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **231**: 590-595.

- Israel R. L., Pond S. L. K., Muse S.V., Katz L. A. (2002). Evolution of duplicated alpha-tubulin genes in ciliates. *Evolution*, **56**: 1110-1122.
- JACUMAR (2009). La acuicultura en España. Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos. Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Secretaría General del Mar.
- James B. D., Olsen G. J., Pace N. R. (1989). Phylogenetic comparative analysis of RNA secondary structure. *Methods in Enzymology*, **180**: 227-239.
- Jankowski A.W. (1985). Life cycles and taxonomy of generic groups Scyphidia, Heteropolaria, Zoothamnium and Cothurnia (class Peritricha). *Trudy Zoologicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR*, **129**: 74-100.
- Jee B.Y., Kim Y.C., Park M.S. (2001). Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **47**(1): 49-55.
- Jerka-Dziadosz M. (1985). Mirror-image configuration of the cortical pattern causes modifications in propagation of microtubular structures in the hypotrich ciliate *Paraurostyla weissei*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, **194**: 311-324.
- Jerka-Dziadosz M., Dosche C., Kuhlmann H.W., Heckmann K. (1987). Signal induced reorganization of the microtubular cytoskeleton in the ciliated protozoon *Euplotes octocarinatus*. *Journal of Cell Science*, **87**: 555-564.
- Jerka-Dziadosz M., Frankel J. (1979). A mutant of *Tetrahymena thermophila* with a partial mirror-image duplication of cell surface pattern. I. Analysis of the phenotype. *Journal of Embryology and Environmental Morphology*, **49**: 167-202.
- Jerka-Dziadosz M., Jenkins L.M., Nelsen E.M., Williams N.E., Jaeckel-Williams R., Frankel J. (1995). Cellular polarity in ciliates: persistence of global polarity in a disorganized mutant of *Tetrahymena thermophila* that disrupts cytoskeletal organization. *Developmental Biology*, **169**: 644-681.
- Jin C.N., Harikrishnan R., Moon Y.G., Kim M.C., Kim J.S., Balasundaram C., Azad I.S., Heo M.S. (2009). Histopathological changes of Korea cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* due to scuticociliatosis caused by histophagous scuticociliate, *Philasterides dicentrarchi*. *Veterinary Parasitology*, **161**: 292-301.
- Joerink M., Groeneveld A., Ducro B., Salvekoul H.F., Wiegertjes G.F. (2007). Mixed infection with *Trypanoplasma borreli* and *Trypanosoma carassii* induces protection: involvement of cross-reactive antibodies. *Developmental and Comparative Immunology*, **31**: 903-915.

- Johansen R., Sommerset I., Tørud B., Korsnes K., Hjortaas M.J., Nilsen F., Nerland A.H., Dannevig B.H. (2004). Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **27**(10): 591-601.
- Jones A. (1970). Some aspects of the biology of the turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with special reference to feeding and growth in the juvenile stage. PhD Thesis, University of East Anglia, U.K., 145 pp.
- Jones A. (1972). *Marine fish farming: an examination of the factors to be considered in the choice of species*. M.A.F.F. Laboratory Leaflet (New Series), n° 24.
- Jørgensen T.R., Buchmann, K. (2007). Stress response in rainbow trout during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* and formalin bath treatment. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **37**(1): 25-28.
- Jousson O., Pretti C., di Bello D., Cognetti-Varriale A.M. (2005). Non-invasive detection and quantification of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* by realtime PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, **65**: 251-255.
- Jung S.J., Im E-Y. (2011). Small subunit ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene sequences of 21 strains of the parasitic scuticociliate *Miamiensis avidus* (Ciliophora, Scuticociliatia). *Parasitology Research*, **108**: 1153-1161.
- Jung S.J., Kitamura S., Song J.Y., Oh, M.J. (2007). *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **73**: 227-234.
- Jung S.J., Kitamura S.I., Aoyama M., Song J.Y., Kim B.K., Oh M.J. (2006). Immune response of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* against *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of Fish Pathology*, **19**: 173-181.
- Jung S.J., Kitamura S.I., Song J.Y., Joung I.Y., Oh M.J. (2005). Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**: 159-162.
- Kaczanowska J., Joachimiak E., Kiersnowska M., Krzywicka A., Golinska K., Kaczanowski, A. (2003). The fenestrin antigen in submembrane skeleton of the ciliate *Tetrahymena thermophila* is proposed as a marker of cell polarity during cell division and in oral replacement. *Protistology*, **154**: 251-264.
- Kamal S.M., Khalifa K.E. (2006). Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections. *Parasite Immunology*, **28**: 483-96.

- Karagouni E., Athanassopoulou F., Tsagozis P., Ralli E., Moustakareas T., Lytra K., Dotsika E. (2005). The impact of a successful anti-myxosporean treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus aurata* L. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **18**: 121-32.
- Katz L.A. (2001). Evolution of nuclear dualism in ciliates: a reanalysis in light of recent molecular data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**: 1587-1592.
- Keck N., Blanc G. (2002). Effects of formalin chemotherapeutic treatments on biofilter efficiency in a marine recirculating fish farming system. *Aquatic Living Resources*, **15**(6): 361-370.
- Kedzierski L., Curtis J.M., Kaminska M., Jodynis-Liebert J., Murias M. (2007). *In vitro* antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania* major promastigotes and amastigotes. *Parasitology Research*, **102**: 91-97.
- Kim S.M., Cho J.B., Lee E.H., Kwon S.R., Kim S.K., Nam Y.K., Kim K.H. (2004b). *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**(3): 239-244.
- Kim S.M., Cho J.B., Kim S.K., Nam Y.K., Kim K.H. (2004a). Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**(3): 233-238.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111-120.
- Kirmse P.D. (1978). *Haemogregarina sachai* n. Sp. from cultured turbot *Scophthalmus maximus* (L.) in Scotland. *Journal of Fish Diseases*, **1**: 337-342.
- Klein B.M. (1926). Ergebnisse mit einer Silbermethode bei Ciliaten. *Archiv für Protistenkunde*, **56**: 243-279.
- Kornilova O.A., Bragina E.E., Chistiakova L.V. (2006). The use of endobiotic ciliates from old collections in transmission electron microscopic investigations. *Parazitologiya*, **40**(2): 192-200.
- Kuhlmann H.W., Heckmann K. (1985). Interspecific morphogens regulating prey-predator relationships in Protozoa. *Science*, **227**: 1347-1349.

- Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, **9**: 299-306.
- Kumazaki T., Hori H., Osawa S. (1983). Phylogeny of protozoa deduced from SS rRNA sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **19**: 411-419.
- Kurz S., Tiedtke A. (1993). The Golgi apparatus of *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**: 10-13.
- Kusch J. (1998). Local and temporal distribution of different genotypes of pond-dwelling *Stentor coeruleus*. *Protist*, **149**: 147-154.
- Kusch J., Schmidt H.J. (2001). Genetically controlled expression of surface variant antigens in free-living protozoa. *The Journal of Membrane Biology*, **180**: 101-109.
- Kwon S.R., Kim C.S., Kim K.H. (2003). Differences between short- and long-term cultures of *Uronema marinum* (Ciliophora: Scuticociliatida) in chemiluminiscence inhibitory activity, antioxidative enzyme and protease activity. *Aquaculture*, **221**: 107-114.
- Lamas J., Morais P., Arranz J.A., Sanmartín M.L., Orallo F., Leiro J. (2009). Resveratrol promotes an inhibitory effect on the turbot scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi* by mechanisms related to cellular detoxification. *Veterinary Parasitology*, **161**: 307-315.
- Lamas J., Sanmartín M.L., Paramá A., Castro R., Cabaleiro S., Ruiz de Ocenda M.V., Barja J.L., Leiro J. (2008). Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite of turbot: Effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen. *Aquaculture*, **278**: 22-26.
- Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**: 6955-6959.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947-2948.
- Lee E.H., Kim K.H. (2008a). Immobilization antigen-independent protection of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) infection. *Aquaculture*, **279**: 211-213.

- Lee E.H., Kim K.H. (2008b). Can surface immobilization antigens of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) be used as target antigens to develop vaccines in cultured fish?. *Fish & Shellfish Immunology*, **24**: 142-146.
- Lee E.H., Kim K.H. (2009). CpG-ODN increases resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatia) infection. *Fish & Shellfish Immunology*, **26**: 29-32.
- Leid R.W., Suquet C.M., Tanigoshi L. (1987). Parasite defense-mechanisms for evasion of host attack e a review. *Veterinary Parasitology*, **25**: 147-62.
- Leiro J., Arranz J.A., Iglesias R., Ubeira F.M., Sanmartín M.L. (2004a). Effects of the histiophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses. *Fish & Shellfish Immunology*, **17**: 27-39.
- Leiro J., Cano E., Ubeira F.M., Orallo F., Sanmartín M.L.. (2004b). *In vitro* effects of the polyphenols resveratrol, mangiferin and epigallocatechin-3-gallate on the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **59**: 171-174.
- Leiro J., Estévez J., Ubeira F.M., Santamarina M.T., Sanmartín M.L. (1994). Serological relationships between two microsporidian parasites of fish. *Aquaculture* **125**: 1-9.
- Leiro J., Iglesias, R., Paramá, A., Aragort, W., Sanmartín, M.L. (2002). PCR detection of *Tetramicra brevivifilum* (microspora) infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) musculature. *Parasitology* **124**: 145-151.
- Leiro J., Paniagua E., Ortega M., Paramá A., Fernandez J., Sanmartin M. (1998). An amoeba associated with gill disease in turbot, *Scophthalmus rnaximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **21**: 281-288.
- Leiro J., Piazzon M.C., Budiño B., Sanmartín M.L., Lamas J. (2008). Complement-mediated killing of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora) by turbot serum: relative importance of alternative and classical pathways. *Parasite Immunology* **30**: 535-543.
- Leiro J., Siso M.I., Paramá A., Ubeira F.M., Sanmartín M.L. (2000). RFLP analysis of PCR amplified small subunit ribosomal DNA of three fish microsporidian species. *Parasitology*, **120**: 113-119.
- Lin X., Song W., Li J. (2007). *Amphileptus aeschtae* nov. spec. and *Amphileptus eigneri* nov. spec. (Ciliophora, Pleurostomatida), two new marine pleurostomatid ciliates from China. *European Journal of Protistology*, **43**(2): 77-86.

- Lindström E.S., Weisse T., Stadler P. (2002). Enumeration of small ciliates in culture by flow cytometry and nucleic acid staining. *Journal of Microbiological Methods*, **49**: 173-182.
- Lipscomb D.L., Riordan G.P. (1990). The ultrastructure of *Chaenea teres* and an analysis of the phylogeny of the haptorid ciliates. *Journal of Protozoology*, **37**: 287-300.
- Long H., Song W., Wang Y., Li, J. (2007). Morphological redescription of two endocommensal ciliates, *Entorhipidium fukuui* Uyemura, 1934 and *Madsenia indomita* (Madsen, 1931) Kahl, 1934 from digestive tracts of sea urchins of the Yellow Sea, China (Ciliophora, Scuticociliatida). *European Journal of Protistology*, **43**(2): 101-114.
- López-Romalde S., Magariños B., Ravelo C., Toranzo A.E., Romalde J.L. (2003). Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*. *Veterinary Microbiology*, **94**(4): 325-333.
- Lowe C.D., Day A., Kemp S.J., Montagnes D.J.S. (2005). There are high levels of functional and genetic diversity in *Oxyrrhis marina*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **52**: 250-257.
- Lucchesi P., Santangelo G. (2004). How often does conjugation in ciliates occur? Clues from a seven-year study on marine sandy shores. *Aquatic Microbial Ecology*, **36**: 195-200.
- Luis L., Ramirez A., Aguilar C.M., Eresh S., Barker D.C., Mendoza-León A. (1998). The genomic fingerprinting of the coding region of the beta-tubulin gene in *Leishmania* identification. *Acta Tropica*, **69**: 193-204.
- Lunden T., Lilius E.M., Byland G. (2002). Respiratory burst activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs. *Aquaculture*, **207**: 203-212.
- Lunden T., Miettinen S., Lönnström L-G., Lilius E.M., Byland G. (1999). Effect of florfenicol on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **67**: 317-325.
- Lynn D. H., Strüder-Kypke M.C. (2005). Phylogenetic relationships among species in the genera *Entodiscus*, *Plagiopyliella*, *Thyrophylax*, and *Entorhipidium*, scuticociliate endosymbionts of echinoids. *Journal of Parasitology*, **91**: 1190-1199.
- Lynn D.H. (1979). Changes in the classification of several major taxa of Ciliophora on the basis of a numerical phenetic analysis. *Journal of Protozoology*, **26**: 359-366.
- Lynn D.H. (2008). *The ciliated protozoa. Characterization, classification and guide to the literature*, 3rd Edition. Springer, New York.

- Lynn D.H., Corliss J.O. (1991). Ciliophora. Microscopic anatomy of invertebrates. *Protozoa*, **1**: 333-467.
- Lynn D.H., Small E.B. (2002). Phylum Ciliophora Doflein, 1901. En *An Illustrated Guide to the Protozoa Vol. 1*, 2nd Edition (Eds. J.J. Lee, G.F. Leedale y P. Bradbury), pp. 371-656. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, USA.
- Lynn D.H., Sogin M.L. (1988). Assessment of phylogenetic relationships among ciliated protists using partial ribosomal RNA sequences derived from reverse transcripts. *BioSystems*, **21**: 249-254.
- Lynn D.H., Strüder-Kypke M.C. (2006). Species of *Tetrahymena* identical by small subunit rRNA gene sequences are discriminated by mitochondrial cytochrome c oxidase I gene sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**(5): 385-387.
- Ma H., Song W. (2003). Stomatogenesis of the marine ciliate *Metanophrys sinensis* (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **83**(2): 407-410.
- Ma H., Song W., Hu X., Warren A. (2003). Morphology and stomatogenesis of *Pseudocohnilembus hargisi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **83**(2): 399-405.
- Ma H., Song W., Warren A., Roberts D., Gong J., Al-Rasheid K.A.S. (2006). Redescription of the marine scuticociliate *Glauconema trihymene* Thompson, 1966 (Protozoa: Ciliophora): life cycle and stomatogenesis. *Zootaxa*, **1296**: 1-17.
- Ma H.W., Song W.B., Ma H.G. (2005). On phylogenetic relationships of Scuticociliatida (Protozoa, Ciliophora) mainly based on stomatogenetic and morphological data. *Acta Zootaxonomica Sinica*, **30**: 684-91.
- Maloney M.S., McDaniel W., Locknar S.A., Torlina H.M. (2005). Identification and localization of a protein immunologically related to caltractin (centrin) in the myonemes and membranelles of the heterotrich ciliate *Stentor coeruleus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **52**(4): 328-338.
- Manoel-Caetano Fda., Silva A.E. (2007). Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cadernos de Saude Publica*, **23**: 2263-2274.
- Martínez-Tapia C., Fernández-Pato C. (1991a). Effect of temperature in early growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) from 0.1 to 500 g. *ICES C.M.1991/F:19*.
- Martínez-Tapia C., Fernández-Pato C. (1991b). Influence of stock density on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) growth. *ICES C.M.1991/F:20*.

- Martín-González A., Borniquel S., Díaz S., Ortega R., Gutiérrez J.C. (2005). Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. *Cell Biology International*, **29**: 119-126.
- Mast S.O. (1909). The reactions of *Didinium nasutum* (Stein) with special reference to the feeding habits and the function of trichocysts. *Biological Bulletin*, **16**: 91-118.
- Mauel J. (1984). Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes. *Parasitology*, **88**: 579-592.
- McArthur C.P., Sengupta S. (1982). Antigenic mimicry of eel tissues by a myxosporidian parasite. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **66**: 249-255.
- Mendoza-León A., Havercroft J.C., Barker D.C. (1995). The RFLP analysis of the beta-tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parasitology*, **111**: 1-9.
- Messick G.A., Small E.B. (1996). *Mesanothryx chesapeakeensis* n. sp., a histophagous ciliate in the blue crab, *Callinectes sapidus*, and associated histopathology. *Invertebrate Biology*, **115**: 1-12.
- Miao M., Warren A., Song W., Wang S., Shang H., Chen Z. (2008). Analysis of the internal transcriber spacer 2 (ITS2) region of scuticociliates and related taxa (Ciliophora, Oligohymenophorea) to infer their evolution and phylogeny. *Protist*, **159**: 519-533.
- Miao W., Fen W.S., Yu Y.H., Zhang X.Y., Shen Y.F. (2004). Phylogenetic relationships of the subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **51**: 80-186.
- Michot B., Qu L.-H., Bachellerie J.P. (1990). Evolution of large-subunit rRNA structure. *European Journal of Biochemistry*, **188**: 219-229.
- Miyake A. (1996). Fertilization and sexuality in ciliates. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K.Hausmann y P. Bradbury), pp. 243-299. Stuttgart, Fischer, Verlag.
- Modeo L., Petroni G., Rosati G., Montagnes J.S. (2003). A multidisciplinary approach to describe protists: redescrptions of *Novistrombidium testaceum* Anigstein 1914 and *Strombidium inclinatum* Montagnes, Taylor, and Lynn 1990 (Ciliophora, Oligotrichia). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**(3): 175-189.
- Modeo L., Rosati G., Andreoli I., Gabrielli S., Verni F., Petroni G. (2006). Molecular systematics and ultrastructural characterization of a forgotten species: *Chattonidium setense* (Ciliophora, Heterotrichea). *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, **82**(9): 359-374.

- Momayezi M., Albrecht P., Plattner H., Schmidt H.J. (2004). Temperature-induced change of variant surface antigen expression in *Paramecium* involves antigen release into the culture medium with considerable delay between transcription and surface expression. *The Journal of Membrane Biology*, **200**: 15-23.
- Montagnes D.J.S., Lynn D.H., Roff J.C., Taylos W.D. (1988). The annual cycle of heterotrophic planktonic ciliates in the waters surrounding the Isles of Shoals, Gulf of Maine: an assessment of their trophic role. *Marine Biology*, **99**: 21-30.
- Montagnes D.J.S., Taylor F.J.R (1994). The salient features of five marine ciliates in the class Spirotrichea (Oligotrichia), with notes on their culturing and behaviour. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **41**: 569-586.
- Morado J.F., Giesecke R.H., Syrjala S.E. (1999). Molt related mortalities of the Dungeness crab *Cancer magister* caused by a marine facultative ciliate *Mesanoophrys pugettensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **38**: 143-150.
- Morado J.F., Small E.B. (1995). Ciliate parasites and related diseases of Crustacea: a review. *Reviews in Fish Sciences*, **3**(4): 275-354.
- Morais P., Lamas J., Sanmartín M.L., Orallo F., Leiro J. (2009). Resveratrol induces mitochondrial alterations, autophagy and a cryptobiosis-like state in scuticociliates. *Protist*, **160**: 552-564.
- Mountassif D., Kabine M., Manar R., Bourhim N., Zaroual Z., Latruffe N., El Kebbaj M.S. (2007). Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the *in vivo* cytotoxicity assessment of metallic pollution: impact on D-b-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecological Indicators*, **7**: 882-889.
- Moustafa E.M.M., Tange N., Shimada A., Morita T. (2010). Experimental Scuticociliatosis in japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Miamiensis avidus*: pathological study on the possible neural routes of invasion and dissemination of the scuticociliate inside the fish body. *Journal of Veterinary Medical Science*, **72**(12): 1557-1563.
- Mullis K.B., Faloona F., Scharf S.J., Saiki R.K., Horn G.T., Erlick H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**: 263-273.
- Munday B.L., O'Donoghue P.J., Watts M., Rough K., Hawkesford T. (1997). Fatal encephalitis due to the scuticociliate *Uronema nigricans* in sea-caged, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **30**(1): 17-25.

- Muñoz P., Sitjà-Bobadilla A., Álvarez-Pellitero P., Meseguer J., Esteban M.A. (2006). Cell-mediated cytotoxicity is the main innate immune mechanism involved in the cellular defence of gilthead seabream (Teleostei: Sparidae) against *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Parasite Immunology*, **28**: 657-665.
- Mustafa A., Speare D.J., Daley J., Conboy G.A., Burka J.F. (2000). Enhanced susceptibility of seawater cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to the microsporidian *Loma salmonae* during a primary infection with the sea louse, *Lepeophtheirus salmonis*. *Journal of Fish Diseases*, **23**: 337-342.
- Muus B.J., Nielsen J.G., Dahlstrom, P., Nyström B. (1998). *Peces de Mar del Atlántico y del mar Mediterráneo. Biología, Pesca, Importancia económica*. Editorial. Omega.
- Nagamune K., Nozaki T., Maeda Y., Ohishi K., Fukuma T., Hara T., Schwarz R. T., Sutterlin C., Brun R., Riezman H., Kinoshita T. (2000). Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**: 10336-10341.
- Nanney D.L., Chow M., Wozencraft B. (1975). Considerations of symmetry in the cortical integration of *Tetrahymena* doublets. *Journal of Experimental Zoology*, **193**: 1-14.
- Nigrelli R.F., Pokorny K.S., Ruggieri G.D. (1976). Notes on *Ichthyophthirius multifiliis*, a ciliate parasitic on fresh-water fishes, with some remarks on possible physiological races and species. *Transactions of the American Microscopical Society*, **95**, 607-613.
- Nishi A., Ishida K., Endoh H. (2005). Reevaluation of the evolutionary position of opalinids based on 18S rDNA, and alpha- and beta-tubulin gene phylogenie. *Journal of Molecular Evolution*, **60**: 695-705.
- Nishizawa T., Savas H., Isidan H., Ustüngağ C., Iwamoto H., Yoshimizu M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from freelifing turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(4): 2373-2378.
- Nougayrede P., Sochon E., Vuillaume A. (1990). Isolation of *Aeromonas* subspecies salmonicida in farmed turbot (*Psetta maxima*) In France. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **10**: 139-140.
- Novoa B., Nuñez S., Fernández C., Figueras A., Toranzo A.E. (1992). Epizootic study in a turbot farm, bacteriology, virology, parasitology and histology. *Aquaculture*, **107**: 253-258.

- Numata O., Gonda K. (2001). Determination of division plane and organization of contractile ring in *Tetrahymena*. *Cell Structure and Function*, **26**: 593-601.
- Oh M.J., Kitamura S.I., Kim W.S., Park M.K., Jung S.J., Miyadai T., Ohtani M. (2006). Susceptibility of marine fish species to a megalocytivirus, turbot iridovirus, isolated from turbot, *Psetta maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **29**(7): 415-421.
- Omoregie E., Eseyin T.G. & Ofojekwu P.C. (1994). Chronic effects of formalin on erythrocyte counts and plasma glucose of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Asian Fisheries Science*, **7**: 1-5.
- Ouaissi A., Ouaissi M. (2005). Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **53**: 102-14.
- Padrós F., Zarza C., Dopazo L., Cuadrado M., Crespo S. (2006). Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **29**(2): 87-94.
- Padrós F., Zarza C.A., Crespo S. (2001). Infecciones por ciliados histiófagos en acuicultura marina: Aspectos histopatológicos. *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas*, **4**: 500-512.
- Paiva T.S., Borges B.N., Harada M.L., Silva-Neto I.D. (2009). Comparative phylogenetic study of Stichotrichia (Alveolata: Ciliophora: Spirotrichea) based on 18S-rDNA sequences. *Genetics and Molecular Research*, **8**: 223-246.
- Palenzuela O., Redondo M.J., Álvarez-Pellitero P. (2002). Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology*, **124**(4): 369-379.
- Palys T., Cohan F.M., Nakamura L.K. (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **47**: 1145-1156.
- Paramá A., Arranz J.A., Álvarez M.F., Sanmartín M.L., Leiro J. (2006). Ultrastructure and phylogeny of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatia) from farmed turbot in NW Spain. *Parasitology*, **132**: 555-564.

- Paramá A., Castro R., Arranz J.A., Sanmartín M.L., Lamas J., Leiro J. (2007a). Scuticociliate cysteine proteinases modulate turbot leucocyte functions. *Fish & Shellfish Immunology* **23**: 945-956.
- Paramá A., Castro R., Lamas J., Sanmartín M.L., Santamarina M.T., Leiro J. (2007b). Scuticociliate proteinases may modulate turbot immune response by inducing apoptosis in pronephric leucocytes. *International Journal for Parasitology*, **37**: 87-95.
- Paramá A., Iglesias R., Álvarez M.F., Leiro J., Aja C., Sanmartín M.L. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot. *Aquaculture*, **217**: 73-80.
- Paramá A., Iglesias R., Alvarez M.F., Leiro J., Ubeira F.M., Sanmartín M.L. (2004). Cysteine proteinase activities in the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Parasitology*, **128**: 541-548.
- Paramá A., Luzardo A., Blanco-Méndez J., Sanmartín M.L., Leiro J. (2005). *In vitro* efficacy of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microspheres against the fishpathogenic ciliate *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**: 151- 158.
- Parker J.G. (1976). Cultural characteristics of the marine Ciliated Protozoan *Uronema marinum* Dujardin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **24**: 213-226.
- Paulin J.J. (1996). Morphology and cytology of ciliates. En: *Ciliates: Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann y P. Bradbury), pp. 1-40. Stuttgart, Fischer, Verlag.
- Pedroso Dias R.J., Da Silva Paiva T., Domingos da Silva-Neto I., D'Agosto M. (2007). Description of a mirror-image doublet from a Brazilian strain of *Gastrostyla setifera* (Engelmann, 1862) Kent, 1882 (Ciliophora: Stichotrichia). *European Journal of Protistology*, **43**(3): 179-184.
- Pérez-Uz B. (1995). Growth rate variability in geographically diverse clones of *Uronema* (Ciliophora: Scuticociliatida). *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 193-204.
- Phadke S.S., Zuffall R.A. (2009). Rapid diversification of mating systems in ciliates. *Biological Journal of the Linnean Society*, **98**(1): 187-197.
- Philippe H., Chenuil A., Adoutte A. (1994). Can the Cambrian explosion be inferred from molecular phylogeny?. *Development*, **120**(Suppl.): 15-25.
- Piazzon C., Lamas J., Castro R., Budiño B., Cabaleiro S., Sanmartín M., Leiro J. (2008). Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates. *Fish & Shellfish Immunology*, **25**: 417-424.

- Piazzon M.C., Wiegertjes G.F., Leiro J., Lamas J. (2011). Turbot resistance to *Philasterides dicentrarchi* is more dependent on humoral than on cellular immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* doi:10.1016/j.fsi.2011.02.026.
- Piazzon M.C. (2010). Interactions between the scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatia) and the immune system of turbot (*Psetta maxima* (L.)). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España), 300 pp.
- Piñeiro-Vidal M., Centeno-Sestelo G., Riaza A., Santos Y. (2007). Isolation of pathogenic *Tenacibaculum maritimum*-related organisms from diseased turbot and sole cultured in the Northwest of Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **27**(1): 29-35.
- Pirola L., Fröjdö S. (2008). Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life*, **60**: 323-332.
- Plouffe D.A., Belosevic M. (2004). Enzyme treatment of *Trypanosoma danilewskyi* (Laveran and Mesnil) increases its susceptibility to lysis by the alternative complement pathway of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **27**: 277-285.
- Poulin R., Morand S. (2000). The diversity of parasites. *Quarterly Review of Biology*, **75**: 277-293.
- Powelson E.E., Gates M.A., Berger J. (1975). A biometrical analysis of 22 stocks of four syngens of *Paramecium aurelia*. *Canadian Journal of Zoology*, **53**: 19-32.
- Prescott D.M. (1994). The DNA of ciliated protozoa. *Microbiological Reviews*, **58**(2):233-267.
- Puytorac P. de (1994). Phylum Ciliophora Doflein, 1901. En *Traité de Zoologie, Tome II, Infusoires Ciliés, Fasc. 2, Systématique* (Ed. P. De Puytorac), pp. 1-15. Masson, Paris.
- Puytorac P. de, Batisse A., Bohatier J., Corliss J.O., Deroux G., Didier P., Dragesco J., Fryd-Versavel G., Grain J., Grolière C.A., Hovasse R., Iftode F., Laval M., Rogue M., Savoie A., Tuffrau M. (1974). Proposition d'une classification du phylum Ciliophora Doflein, 1901. *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences, Paris* **278**: 2799-2802.
- Puytorac P. de, Grain J., Legendre P., Devaux J. (1984). Essai d'application de l'analyse phénétique à la classification du phylum des Ciliophora. *Journal of Protozoology*, **31**: 496-507.

- Quintela J.M., Peinador C., González L., Iglesias R., Paramá A., Álvarez F., Sanmartín M.L., Riguera R. (2003). Piperazine N-substituted naphthyridines, pyridothienopyrimidines and pyridothienotriazines: new antiprotozoals active against *Philasterides dicentrarchi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **38**: 265-275.
- R Development Core Team. (2011). *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Raa J. (1996). The Use of Immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. *Reviews in Fisheries Science*, **4**(3): 229-288.
- Rach J.J., Gaikowski M.P., Olson J.J. (1997). Importance of analytically verifying chemical treatments. *Progressive Fish-Culturist*, **59**: 222-228.
- Rach J.J., Gaikowski M.P., Ramsay R.T. (2000). Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatchery-reared fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, **12**(4): 267-273.
- Ragan M.A., Cawthorn R.J., Despres B., Murphy C.A., Singh R.K., Loughlin M.B., Bayer R.C. (1996). The lobster parasite *Anophryoides haemophila* (Scuticociliatida: Orchitophryidae): nuclear 18S rDNA sequence, phylogeny and detection using oligonucleotide primers. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **43**(4): 341-346.
- Raikov I.B., Kovaleva V.G. (1990). Ultrastructure of the nuclear apparatus of the lower ciliate *Remanella granulosa* Kahl (Karyorelictida). *Protoplasma*, **115**(1-3): 106-115.
- Ramos M.F., Costa A.R., Barandela T., Saraiva A., Rodrigues P.N. (2007). Scuticociliate infection and pathology in cultured turbot *Scophthalmus maximus* from the north of Portugal. *Diseases of Aquatic Organisms*, **74**(3): 249-253.
- Rijkers G.T., Tounissen A.G., Oosterom R.V., Muiswinkel W.B.V. (1980). The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, **19**: 177-189.
- Riley J.D., Symonds D.J., Woolner L. (1981). On the factors influencing the distribution of 0-group demersal fish in coastal waters. The early life history of fish: recent studies. *Rapports et procès-verbaux des réunions – Commission Internationale pour l'Exploration de la Mer*, **178**: 223-228.
- Robinson T., Katz L.A. (2007). Non-Mendelian inheritance of paralogs of 2 cytoskeletal genes in the ciliate *Chilodonealla uncinata*. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 2495-2503.

- Rohde K. (2002). Ecology and biogeography of marine parasites. *Advances in Marine Biology*, **43**: 1-86.
- Romalde J.L., Magariños B., Villar C., Barja J.L., Toranzo A.E. (1999). Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. *FEMS Microbiology Letters*, **179**: 297-304.
- Rossteuscher S., Wenker C., Jermann T., Wahli T., Oldenberg E., Schmidt-Posthaus H. (2008). Severe scuticociliate (*Philasterides dicentrarchi*) infection in a population of sea dragons (*Phycodurus eques* and *Phyllopteryx taeniolatus*). *Veterinary Pathology*, **45**: 546-550.
- Ruiz F., Garreau de Loubresse N., Beisson J. (1987). A mutation affecting basal body duplication and cell shape in *Paramecium*. *Journal of Cell Biology*, **104**: 417-430.
- Sakai M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, **172**: 63-92.
- Sánchez F.J., Peleteiro J.B., Forés R., Olmedo M., Iglesias J. (1990) . Crecimiento del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) en condiciones experimentales de cultivo. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, **6**(1): 127-132.
- Sanmartín M.L., Paramá, A., Castro R., Cabalerio S., Leiro J., Lamas J., Barja J.L. (2008). Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Diseases*, **31**: 135-140.
- Sanmartín M.L., Quinteiro P., Rodríguez A., Fernández J.A. (1989). Some Spanish cestode fish parasites. *Journal of Fish Biology*, **34**: 977-978.
- Scharsack J.P., Kalbe M., Derner R., Kurtz J., Milinski M. (2004). Modulation of granulocyte responses in three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* infected with the tapeworm *Schistocephalus solidus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **59**: 141-150.
- Schlegel M., Elwood H.J., Sogin M.L. (1991). Molecular evolution in hypotrichous ciliates: sequence of the small subunit ribosomal RNA genes from *Onychodromus quadricornutus* and *Oxytricha granulifera* (Oxytrichidae, Hypotrichida, Ciliophora). *Journal of Molecular Evolution*, **32**: 64-69.
- Schmidt S.L., Bernhard D., Schlegel M., Fried J. (2006). Fluorescence in situ hybridization with specific oligonucleotide rRNA probes distinguishes the sibling species *Stylonychia lemnaea* and *Stylonychia mytilus* (Ciliophora, Spirotrichea). *Protist*, **157**: 21-30.

- Schmidt S.L., Schlegel M., Bernhard D. (2007). Molecular phylogeny of the Heterotrichea (Ciliophora, Postciliodesmatophora) based on small subunit rRNA gene sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **54**: 358-363.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L., Arlequin v 3.11. Genetics and Biometry Laboratory, University 245 of Geneva, Geneva, Switzerland) (<http://www.cmpg.unibe.ch/>).
- Sealey W. M., Gatlin D. M. (2001). Overview of nutritional strategies affecting the health of marine fish. En *Nutrition and fish health* (Eds. C. Lim y C.D. Webster), pp. 103-118.
- Seed J. (1978). Competition among serologically different clones of *Trypanosoma brucei gambiense* in vivo. *Protozoology*, **25**: 526-529.
- Segade P., Kher C.P., Lynn D.H., Iglesias R. (2009). Morphological and molecular characterization of renal ciliates infecting farmed snails in Spain. *Parasitology*, **136**: 771-782.
- Shang H., Song W., Warren A. (2003). Phylogenetic positions of two ciliates, *Paranophrys magna* and *Mesanophrys carcini* (Ciliophora: Oligohymenophorea), within the subclass Scuticociliatia inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. *Acta Protozoologica*, **42**: 171-181.
- Shang H., Song W., Warren A., Li L., Chen Z. (2006). Phylogenetic positions of two marine ciliates, *Metanophrys similis* and *Pseudocohnilembus hargisi* (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatia), inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. *Progress in Natural Science*, **16**: 373-378.
- Shang Y., Li B., Gorovsky M.A. (2002). *Tetrahymena thermophila* contains a conventional gamma-tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers. *Journal of Cell Biology*, **158**: 1195-1206.
- Shao C., Hu X., Warren A., Al-Rasheid K.A.S., Al-Quraishy S.A., Song W. (2007). Morphogenesis in the marine spirotrichous ciliate *Apokeronopsis crassa* (Claparède & Lachmann, 1858) n. comb. (Ciliophora: Stichotrichia), with the establishment of a new genus, *Apokeronopsis* n. g., and redefinition of the genus *Thigmokeronopsis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **54**(4): 392-401.
- Shen Z., Shao C., Gao S., Lin X., Li J., Hu X., Song W. (2009). Description of the rare marine ciliate, *Uronychia multicirrus* Song, 1997 (Ciliophora; Euplotida) based on morphology, morphogenesis and SS rRNA gene sequence. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **56**(3): 296-304.

- Siegel R.W. (1956). Mating types in *Oxytricha* and the significance of mating type systems in ciliates. *Biological Bulletin*, **110**: 352-357.
- Simpson E. (2006). A historical perspective on immunological privilege. *Immunological Reviews*, **213**: 12-22.
- Sitjà-Bobadilla A. (2008). Living off a fish: A trade-off between parasites and the immune system. *Fish & Shellfish Immunology*, **25**: 358-372.
- Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P. (1993). Population dynamics of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitjà-Bobadilla et Alvarez-Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitjà-Bobadilla et Alvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporea: Bivalvulida) infections in wild and cultured Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Parasitology*, **106**: 39-45.
- Sitjà-Bobadilla A., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P. (2008). Immune response of turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces: Teleostei), to formalin-killed scuticociliates (Ciliophora) and adjuvanted formulations. *Fish & Shellfish Immunology*, **24**: 1-10.
- Sitjà-Bobadilla A., Redondo M.J., Bermúdez R., Palenzuela O., Ferreira I., Riaza A., Quiroga I., Nieto J.M., Álvarez-Pellitero P. (2006). Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporea: Myxozoa). *Fish & Shellfish Immunology*, **21**: 485-500.
- Siwicki A.K., Anderson D.P., Dixon D.W. (1989). Comparisons on nonspecific and specific immunomodulation by oxolinic acid, oxytetracycline and levamisole in salmonids. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **23**: 195-200.
- Small E.B. (1967). The Scuticociliatida, a new order of the Ciliata (Phylum Protozoa, Subphylum Ciliophora). *Transactions of the American Microscopical Society*, **86**: 354-370.
- Small E.B., Lynn D.H. (1985). Phylum Ciliophora. En *An Illustrated Guide to the Protozoa*, 1st Edition (Eds. J.J. Lee, S.H. Hutner y E.C. Bovee). Society of Protozoologists Special Publication, Allen Press, Lawrence, Kansas, USA.
- Snoeyenbos-West O.L.O., Cole J., Campbell A., Coats D.W., Katz L.A. (2004). Molecular phylogeny of phyllopharyngean ciliates and their group I Introns. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **51**(4): 441-450.
- Sogin M.L., Swanton M.T., Gunderson J.H., Elwood H.J. (1986). Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene from the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*. *Journal of Protozoology*, **33**: 26-29.

- Sogin S. J., Sogin M. L., Woese C. R. (1971). Phylogenetic measurement in procaryotes by primary structural characterization. *Journal of Molecular Evolution*, **1**: 173-184.
- Sommerset I., Krossøy, Biering E., Frost P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, **4**(1): 89-101.
- Sommerville J. (1970). Serotype expression in *Paramecium*. *Advances in Microbial Physiology*, **4**: 131-178.
- Son I.H., Chung I.M., Lee S.J., Moon H.I. (2007). Antiplasmodial activity of novel stillbene derivatives isolated from *Parthenocissus tricuspidata* from South Korea. *Parasitology Research*, **101**: 237-241.
- Song J.Y., Kitamura S., Oh M.J., Kang H.S., Lee J.H., Tanaka S.J., Jung S.J. (2009a). Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, **83**: 133-143.
- Song J.Y., Sasaki K., Okada T., Sakashita M., Kawakami H., Matsuoka S., Kang H.S., Nakayama K., Jung S.J., Oh M.J., Kitamura S.I. (2009b). Antigenic differences of the scuticociliate *Miamiensis avidus* from Japan. *Journal of Fish Diseases*, **32**(12): 1027-1034.
- Song W. (2005). Taxonomic description of two new marine oligotrichous ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Journal of Natural History*, **39**(3): 241-252.
- Song W., Warren A., Roberts D., Shang H., Ma H., Wilbert N., Miao M., Yi Z. (2005). Re-evaluation of the phylogenetic position of the genus *Dexiotrichides* (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatida) inferred from stomatogenetic and molecular information for *Dexiotrichides pangi*. *Progress in Natural Science*, **15**(8): 700-707.
- Song W., Wilbert N. (2000). Redefinition and redescription of some marine scuticociliates from China, with report of a new species, *Metanophrys sinensis* nov. spec. (Ciliophora, Scuticociliatida). *Zoologischer Anzeiger*, **239**: 45-74.
- Sonneborn T. M. (1963). Does preformed cell structure play an essential role in cell heredity?. En *The nature of biological diversity* (Ed. J.M. Allen), pp. 165-221. McGraw-Hill, New York.
- Stechmann A.M, Lynn D.H. (1998). Phylogenetic relationships between prostome and colpodean ciliates tested by small subunit rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**: 48-54.
- Sterud E., Hansen M.K., Mo T.A. (2000). Systemic infection with *Uronema*-like ciliates in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **23**: 33- 37.

- Stickney R.R. (1997). Offshore mariculture. En *Sustainable Aquaculture* (Ed. J.E. Bardach), pp. 53-86. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA..
- Stoeck T., Welter H., Seitz-Bender D., Kusch J., Schmidt H.J. (2000). ARDRA and RAPD-fingerprinting reject the sibling species concept for the ciliate *Paramecium caudatum* (Ciliophora, Protocista). *Zoologica Scripta*, **29**: 75-82.
- Straus D.L., Hossain M.M., Clarck T.G. (2009). Copper sulfate toxicity to two isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* relative to alkalinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, **83**: 31-36.
- Straus D.L., Meinelt T. (2009). Acute toxicity of paracetic acid (PAA) formulation to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Parasitology Research*, **104**: 1237-1241.
- Strzyzewska-Jówko I., Jerka-Dziadosz M., Frankel J. (2003). Effect of alteration of the global body plan on the deployment of morphogenesis related epitopes labeled by the monoclonal antibody 12G9 in *Tetrahymena thermophila*. *Protist*, **154**: 71-90.
- Sugiura M., Harumoto T. (2001). Identification, characterization and complete amino acid sequence of the conjugation-inducing glycoprotein (blepharhormone) in the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 14446-14451.
- Tafalla C., Novoa B., Alvarez J.M., Figueras A. (1999). *In vivo* and *in vitro* effect of oxytetracycline treatment on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **21**: 271-276.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596-1599.
- Tartar V. (1956). Pattern and substance in *Stentor*. *Symposium of the Society for Developmental Biology*, **14**: 73-100.
- Thomas F., Brodeur J., Maure F., Franceschi N., Blanchet S., Rigaud T. (2011). Intraspecific variability in host manipulation by parasites. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**: 262-269.
- Thompson J.C, Moewus L. (1964). *Miamiensis avidus* n. g., n. sp., a marine facultative parasite in the ciliate order Hymonostomatida. *Journal of Protozoology*, **11**: 378-381.
- Thompson R.C., Lymbery A.J. (1996). Genetic variability in parasites and host-parasite interactions. *Parasitology*, **112**(Supl.): S7-S22.
- Thompson R.C.A. (1988). Intraspecific variation and epidemiology. En *Parasitology in Focus* (Ed. H. Melhorn), pp. 391-411. Springer, Berlin.

- Thrasher J.D., Kilburn K.H. (2001). Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Archives of Environmental Health*, **56**: 300-311.
- Toranzo A.E., Santos Y., Lemos I.M.L., Ledo A., Bollnches J. (1987). Homology of *Vibrio anguillarum* strains causing epizootics in turbot, salmon and trout reared on the Atlantic coast of Spain. *Aquaculture*, **67**: 41-52.
- Tröger J., Haussmann K. (2005). Spontaneous and heat shock-induced irregularities in the cell structure of *Didinium cf. nasutum*. *European Journal of Protistology*, **41**: 1-5.
- Valbonesi A., Ortenzi C., Luporini P. (1988). An integrated study of the species problem in the *Euplotes crassusminuta-vannus* group. *Journal of Protozoology*, **35**: 38-45.
- Valenzano D.R., Terzibasi E., Genade T., Cattaneo A., Domenici L., Cellerino A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a shortlived vertebrate. *Current Biology*, **16**: 296-300.
- Vannier-Santos M.A., Martiny A., De Souza W. (2002). Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, **8**: 297-318.
- Vd'áčný, P. (2007). Morphological and taxonomical studies on two soil haptorid ciliates (Ciliophora, Litostomatea): *Clavoplites haranti* sp. n. and *Enchelys terrenum* (Foissner, 1984) comb. n., and taxonomy of the family Enchelyidae Ehrenberg, 1838. *European Journal of Protistology*, **43**: 225-237.
- Venables W.N., Ripley B.D. (2002). Modern applied statistics with S. 4th Edition. Springer, New York.
- Villamil L., Figueras A., Toranzo A.E., Planas M., Novoa B. (2003). Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. *Journal of Fish Diseases*, **26**: 293-303.
- Ward D.M. (2006). A macrobiological perspective on microbial species. *Microbe*, **1**: 269-278.
- Ward D.M., Cohan F.M., Bhaya D., Heidelberg J.F., Khül M., Grossman A. (2008). Genomics, environmental genomics and the issue of microbial species. *Heredity*, **100**, 207-219.
- Wedemeyer G. (1971). The stress of formalin treatment in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **28**: 1899-1904.
- Weisse T. (2002). The significance of inter- and intraspecific variation in bacterivorous and herbivorous protists. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**: 327-341.

- Weisse T. (2004). *Meseres corlissi*: a rare oligotrich ciliate adapted to warm water and temporary habitats. *Aquatic Microbial Ecology*, **37**: 75–83.
- Weisse T. (2006). Biodiversity of freshwater microorganisms – Achievements, problems, and perspectives. *Polish Journal of Ecology*, **54**(4): 633–652.
- Weisse T., Lettner S. (2002). The ecological significance of intraspecific variation among freshwater ciliates. *Verhandlungen des Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, **28**: 1880–1884.
- Weisse T., Montagnes D. J. S. (1998). Effect of temperature on inter- and intraspecific isolates of *Urotricha* (Prostomatida, Ciliophora). *Aquatic Microbial Ecology*, **21**: 97–102.
- Weisse T., Rammer S. (2006). Pronounced ecophysiological clonal differences of two common freshwater ciliates, *Coleps spetai* (Prostomatida) and *Rimostrombidium lacustris* (Oligotrichida), challenge the morphospecies concept. *Journal of Plankton Research*, **27**: 55–63.
- Weisse T., Scheffel U., Stadler P., Foissner W. (2007). Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. II. Response to pH. *Aquatic Microbial Ecology*, **47**: 289–297.
- Weisse T., Strüder-Kypke, M.C., Berger H., Foissner W. (2008). Genetic, morphologic, and ecological diversity of spatially separated clones of *Meseres corlissi* Petz & Foissner, 1992 (Ciliophora, Spirotrichea). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **55**: 257–270.
- Welsh J., McClelland M. (1990). Fingerprints genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 7213–7218.
- Wiacowski K., Hryniewiecka-Szyfter Z., Babula A. (1999). How many species are in the genus *Mesanophrys* (Protista, Ciliophora, Facultative parasites of marine crustaceans)? *European Journal of Protistology*, **35**: 379–389.
- Wickham S.A, Lynn D.H. (1990). Relations between growth rate, cell size, and DNA content in colpodean ciliates (Ciliophora: Colpodea). *European Journal of Protistology*, **25**: 345–352.
- Wicklow B.J. (1997). Signal-induced defensive phenotypic changes in ciliated protists: morphological and ecological implications for predator and prey. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **44** (3): 176–188.

- Wiegertjes G.F. (1995). Genetic-variation in susceptibility to *Trypanoplasma borreli* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **47**: 153-61.
- Wiegertjes G.F., Forlenza M., Joerink M., Scharsack J.P. (2005). Parasite infections revisited. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**: 749-758.
- Wilks S.A., Sleigh M.A. (2004). Lectin binding sites on *Euplotes mutabilis* (Tuffrau, 1960) and the implications for food particle selection. *European Journal of Protistology*, **40** (2): 153-162.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531-6535.
- Williams N.E., Tsao C., Bowen J., Hehman G.L., Williams R.J., Frankel J. (2006). The actin gene *ACT1* is required for phagocytosis, motility, and cell separation of *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryotic Cell*, **5**(3), 555-567.
- Windle R.G. (1996). Genetic control of resistance to helminths in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **54**: 245-254.
- Wongtavatchai J., Conrad P.A., Hedrick R.P. (1995). Effect of the microsporidian *Enterocytozoon salmonis* on the immune response of chinook salmon. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **48**: 367-74.
- Wood S.N. (2003). Thin plate regression splines *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Statistical Methodology)*, **65**: 95-114.
- Wood S.N. (2006). Generalized additive models: an introduction with R. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Wright A.D., Dehority B.A., Lynn D.H. (1997). Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea:Entodiniomorphida) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **44**: 61-67.
- Xia X. (2001). *Data analysis in molecular biology and evolution*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Xia X., Xie Z. (2001). DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, **92**: 371-373.
- Yano J., Suhamma M. (1991). Pattern formation in mirror-image doublets of the hypotrich ciliate *Stylonychia pustulata*. *Journal of Protozoology*, **38**: 111-121.

- Ye A.J., Romero D.P. (2002). Phylogenetic relationships amongst tetrahymenine ciliates inferred by a comparison of telomerase RNAs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**: 2297-2302.
- Yi Z., Song W., Clamp J.C., Chen Z., Gao S., Zhang Q. (2009). Reconsideration of systematic relationships within the order Euplotida (Protista, Ciliophora) using new sequences of the gene coding for small-subunit rRNA and testing the use of combined data sets to construct phylogenies of the *Diophrys*-complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **50**: 599-607.
- Yi Z., Song W., Shao C., Warren A., Al-Rasheid K.A., Roberts D.M., Miao M., Al-Quraishy S.A., Chen Z. (2008). Phylogeny of some systematically uncertain urostyloids--*Apokeronopsis*, *Metaurostylopsis*, *Thigmokeronopsis* (Ciliophora, Stichotrichia) estimated with small subunit rRNA gene sequence information: discrepancies and agreements with morphological data. *European Journal of Protistology*, **44**: 254-62.
- Yi Z., Wang Y., Lin X., Al-Rasheid K.A.S, Song W. (2010). Phylogeny of subclass Scuticociliatia (Protozoa, Ciliophora) using combined data inferred from genetic, morphological, and morphogenetic evidence. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **28**(4): 778-784.
- Yli-Mattila T., Mach R.L., Alekhina I.A., Bulat S.A., Koskinen S., Kullnig-Gradinger C.M., Kubicek C.P., Klemsdal S.S. (2004). Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, beta-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology*, **95**: 267-285.
- Yoshinaga T., Nakazoe J-I. (1993). Isolation and in vitro cultivation of an unidentified ciliate causing scuticociliatosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathology (Gyobyō Kenkyū)*, **28**: 131-134.
- Yousefian M., Amiri M.S. (2009). A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology*, **8**(25): 7313-7318.
- Yudin A.L., Uspenkaya Z.I. (2002). Serotypes in the ciliate *Dileptus anser*: epigenetic phenomena. *Protistology* **2**(3): 142-151.
- Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutiérrez-de Frias C., Cortés A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**: 126-36.

- Zhang Q.Y., Tao J.J., Gui L., Zhou G.Z., Ruan H.M., Li Z.Q., Gui J.F. (2007). Isolation and characterization of *Scophthalmus maximus* rhabdovirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, **74**(2): 95-105.
- Zufall R.A., Katz L.A. (2007). Micronuclear and macronuclear forms of β -tubulin genes in the ciliate *Chilodonella uncinata* reveal insights into genome processing and protein evolution. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **54**(3): 275-282.
- Zuker M., Stiegler P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Research*, **9**: 133-148.